

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)  
09 octobre 1998 (09.10.98)

Demande internationale no  
PCT/FR97/00290

Date du dépôt international  
14 février 1997 (14.02.97)

Déposant

INSTITUT PASTEUR etc

Le Bureau international transmet ci-joint le nombre de copies indiqué ci-après des documents suivants:

\_\_\_\_\_ copie de la traduction en langue anglaise du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3a))

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

P. Asseeff

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

002277349

**This Page Blank (uspto)**



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

**PCT**

**NOTIFICATION D'ELECTION**

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition 21 août 1997 (21.08.97)	
Demande internationale no: PCT/FR97/00290	Référence du dossier du déposant ou du mandataire: B3044A-EG
Date du dépôt international: 14 février 1997 (14.02.97)	Date de priorité: 14 février 1996 (14.02.96)
Déposant: LONGACRE-ANDRE, Shirley etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

24 juillet 1997 (24.07.97)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

<p>Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse</p> <p>no de télécopieur: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Fonctionnaire autorisé:</p> <p>J. Zahra</p> <p>no de téléphone: (41-22) 338.83.38</p>
---	--

**This Page Blank (uspto)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

COMMUNICATION OF  
INTERNATIONAL APPLICATIONS

(PCT Article 20)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing:

23 October 1997 (23.10.97)

in its capacity as designated Office

The International Bureau transmits herewith copies of the international applications having the following international application numbers and international publication numbers:

International application no.:

PCT/FR97/00290

International publication no.:

WO97/30158

**CORRECTED VERSION  
VERSION CORRIGEE**

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**This Page Blank (uspto)**

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference B3044A-EG	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR97/00290	International filing date (day/month/year) 14 February 1997 (14.02.1997)	Priority date (day/month/year) 14 February 1996 (14.02.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/30, 15/86, C07K 14/445, 16/20		
Applicant INSTITUT PASTEUR		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>          </u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 24 July 1997 (24.07.1997)	Date of completion of this report 14 May 1998 (14.05.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0

**This Page Blank (uspto)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR97/00290

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-41, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-45, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**This Page Blank (uspto)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR97/00290

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 3, 23

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

**This Page Blank (uspto)**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 97/00290

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I I I

- 1) Claim 3 is unclear. The features which define the protein cannot be assessed. The inhibition of "the reactivity of an immune human antiserum with the corresponding p42" ? "and this p42 itself" ? are unclear features.
- 2) Claim 23 is unclear. It refers to claim 20 which does not recognize P.vivax, whereas the additional feature of claim 23 is the specific recognition of P.vivax.

***This Page Blank (uspto)***

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 97/00290

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	9, 13-15, 19, 24-31, 33-45	YES
	Claims	1, 2, 4-8, 10-12, 16-18, 20-22, 32	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	9, 13-15, 19, 24-31, 33-45	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 2, 4-22, 24-45	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1) Citations

Reference is made to the following documents:

D1 Molecular and Biochemical Parasitology, vol.74, no.1, 20 December 1995, pp.105-111. Longacre S. et al.

D2 Molecular and Biochemical Parasitology, vol.64, no.2, 1 January 1994, p.1991-2005, Longacre S. et al.

D3 WO-A-9317107

D4 Molecular and Biochemical Parasitology, vol.60, no.2, 1 January 1993, pp.303-310, Chappel J.A. and Holder A.A.

D5 EP-A-154454

#### 2) Priority (PCT Article 8)

Claim 1 of the present application refers to "a protein of which the essential constituent polypeptide sequence is that of either a C-terminal fragment of 19 kilodaltons of the surface (MSP-1) protein 1 which is infectious for mammals....", whereas the priority document refers only to man (priority document, p.4, lines 21 to 23).

This Page Blank (uspto)

Claim 2 refers to "a protein recognized by human antiserums...or against an equivalent Plasmodium when it is in an unreduced state or in a non-irreversible reduced state, but unrecognized or little recognized by these same antiserums when it is in an irreversible reduced state", whereas the priority document refers only to proteins recognized by human serums formed against the corresponding Plasmodium (priority document p.14, lines 13 to 16).

Claim 44 refers to "a vaccine composition selected from among the following mixtures:...". None of the mixtures cited in said claim is described in the priority document.

Finally, claim 45 refers to a CNCM 1-1846 hybridome. No CNCM 1-1846 hybridome is mentioned in the priority document.

Consequently, the above expressions which are not supported by the content of the priority document are amendments which extend the subject matter of the application beyond its original content. The claims which contain the amendments do not therefore enjoy the priority connected with document FR96-01822 (14 February 1996). Document P(x) cited in the international search report can therefore be considered to form part of the prior art relating to these claims.

**3) Novelty (PCT Article 33(2))**

- 3.1) A recombinant protein, of which the essential constituent polypeptide sequence is that of an MSP-1 19kDa C-terminal fragment of a Plasmodium type parasite which is infectious for mammals, has been described in document D3 (see claim 3 and Fig.4 at

**This Page Blank (uspto)**



the bottom of the page "MSP1<sub>19</sub>"). The polypeptide sequence comes from a *Plasmodium falciparum* strain. This strain is infectious for man.

D3 describes the use of a portion of this fragment or peptide (see D3, claim 1 or 2) with the amino acid sequence described in Fig.6 (*P.yoellii*) so as to induce an immune response (see example 2 and Table 1).

Claim 1 is therefore not novel. The same conclusion applies to claims 4 to 8 and 12.

3.2) D4, which contains the same constructions as D3, shows that an immune rabbit serum obtained by means of *P.falciparum* MSP-1 is able to detect them (see D4, Fig.4). The simple fact that a protein is characterized by parameters which have not been measured, such as for example in claim 2 the recognition of the proteins by a human antiserum, does not make this protein novel.

3.3) D3 shows that following dialysis of the combined MSP-EGF fragment, the compound is soluble in PBS (see D3, p.17, first paragraph). Claims 10 and 11 are not novel.

3.4) D3 describes the production of polypeptide as detailed in claim 1 (see D3, Figs.1 and 2 and point 3.1 above) fused with a GST or other group (see D3, p.6, second paragraph or p.14, first paragraph). Claim 16 is therefore not novel.

3.5) Vaccines containing the proteins described in 3.1) above are known from the prior art (see D3, claims 11 and 12, and table 2). Claims 17 and 18 are not novel.

3.6) Monoclonal antibodies recognizing the MSP-1 protein

**This Page Blank (uspto)**

p19 fragment of a Plasmodium falciparum, which is infectious for man, have been described in D4 (see p.306, lines 12 to 16 and Figs.2 to 4). Claims 20 to 22 are not therefore novel.

The fact that the antibodies of claims 20 to 23 do not recognize P.vivax cannot be considered, as this parameter could be satisfied provided it were measured.

- 3.7) A DNA sequence coding for P.falciparum MSP-1 is described in the prior art (see D5, Fig.1 A-1). Claim 32 is not therefore novel.

**4) Inventive step (PCT Article 33(3))**

- 4.1) Document D2 discloses (Fig.2) constructions comprising the P.vivax amino acid sequence (see also D2, p.193, third paragraph). In order to obtain a protein anchored to the surface of the Sf9 cell (insect cell) comprising a glycosylphosphatidylinositol (GPI) group (see D2, p.197, col.2, lines 4 to 9), coming from a Plasmodium strain other than that coming from P.vivax, a person skilled in the art will exchange the P.vivax sequence (PV19A) with a corresponding P.falciparum sequence. Results indicate that such a sequence (GPI) is also present in P.falciparum (see D2, p.197, col.2, second paragraph). No inventive step can be recognized for claim 9.
- 4.2) Document D2 discloses (Fig.2) constructions comprising the P.vivax amino acid sequence (see also D2, p.193, third paragraph). In order to obtain a protein coming from a Plasmodium strain other than that coming from P.vivax, a person skilled in the art will exchange the P.vivax sequence (PV19A or

***This Page Blank (uspto)***

PV19S) with the corresponding *P.cynomolgi* sequence. Document D1 discloses (Fig.1) the *P.cynomolgi* amino acid sequence.

Similarly, in order to obtain a fragment similar to that described in D3, i.e. a p19 fragment or a portion thereof containing one or more EGF units (see point 3.1 above), a person skilled in the art would replace the *P.falciparum* sequence with that corresponding to *P.cynomolgi*. No inventive step can be recognized for claim 13.

- 4.3) Oligomers, vaccines containing oligomers, a diagnostic method using antibodies (see point 3.5 above), baculovirus-type vectors (see D2, title and p.192, col.1, last paragraph up to col.2, line 11) with a G and C content of between 40 and 60 (see D1, p.107, lines 4 to 9), baculovirus-type vectors containing a nucleotide sequence deprived of their 3'terminal hydrophobe end (see D2, Fig.2, PV19S), hosts transfected by such vectors (D2, p.192, col.2, first paragraph), PvMSP1-p19A, PvMSP1-p19S, pfMSP1-p19A, PfMSP1-p19S or PcMSP1-p19S vectors (see D2, Fig.2), amino acid sequences (see D1, p.106, Fig.1; D3, Figs.1, 2, 6), DNAs which possess a *P.vivax* signal sequence, DNAs which possess a region coding for an anchoring amino acid sequence (see D2, p.194, lines 8 to 11 and Fig.2 PV19A), hybridomes or more precisely a hybridome recognizing *P.falciparum* such as CNCM-1-1846, separation methods, the use of proteins for preparing vaccines, and vaccines characterized by a mixture of active ingredients are applications or embodiments known from the prior art.

The combination of these applications or embodiments, claimed in the present application, with objects which do not satisfy the criteria of PCT Article 33(2) or (3) (see points 3 or 4 above)

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 97/00290

is a choice which a person skilled in the art would have made according to the cases in question. Claims 14-15, 19, 24-31 and 33-45 are not inventive.

**This Page Blank (uspto)**



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE A LA PRESENTATION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

GUTMANN, Ernest  
Yves Plasseraud S.A.  
3, rue Chauveau-Lagarde  
F-75008 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)

20 mars 1997 (20.03.97)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

B3044A-EG

## NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale no

PCT/FR97/00290

Date du dépôt international

14 février 1997 (14.02.97)

Date de priorité

14 février 1996 (14.02.96)

Déposant

INSTITUT PASTEUR etc

La date de réception par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes suivantes est notifiée au déposant:

Demande antérieure no:Date de priorité:Pays dans lequel ou pour lequel  
la demande a été déposée:Date de réception du  
document de priorité

9601822

14 fév 1996 (14.02.96)

FR

17 mar 1997 (17.03.97)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé:

N. Lindner

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

no de téléphone: (41-22) 730.91.11

**This Page Blank (uspto)**

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

GUTMANN, Ernest  
Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A.  
3, rue Chauveau-Lagarde  
F-75008 Paris  
FRANCE

REÇU LE

29 AOUT 1997

E. GUTMANN - Y. PLASSERAUD S.A.

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 août 1997 (21.08.97)		AVIS IMPORTANT	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B3044A-EG			
Demande internationale no PCT/FR97/00290	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14 février 1997 (14.02.97)	Date de priorité (jour/mois/année) 14 février 1996 (14.02.96)	
Déposant INSTITUT PASTEUR etc			

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:  
AU,CA,CN,EP,JP,KP,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:

Aucun

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 21 août 1997 (21.08.97) sous le numéro WO 97/30158

**RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)**

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

**RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))**

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

**This Page Blank (uspto)**

# PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>B3044A - EG</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/ FR 97/ 00290</b>	Date du dépôt international( <i>jour/mois/année</i> ) <b>14/02/1997</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) ( <i>jour/mois/année</i> )) <b>14/02/1996</b>
Déposant  <b>INSTITUT PASTEUR et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 6 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☒ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

2. ☒ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

3. ☒ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence

☐ déposé avec la demande internationale

☒ fourni par le déposant séparément de la demande internationale

☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.

☐ transcrit par l'administration

4. En ce qui concerne le titre, ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT C-TERMINAL DE MSP-1 DE PLASMODIUM**

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:

Figure n°            ☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

**This Page Blank (uspto)**

**Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
**voir annexe**
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

**voir annexe**

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

**This Page Blank (uspto)**



## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/210

**1. Revendications 1 2 4-16, 18, 26, 42, 43 et partiellement 17, 19, 25, 27-39 :**

Protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

.soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, autre que *Plasmodium vivax*, et infectieux pour des Mammifères, notamment pour l'Homme;

. soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie *in vivo* due au parasite correspondant;

. soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment;

vecteur baculoviral pour l'expression de cette protéine, organisme transfecté par un tel vecteur, ADN synthétique contenant une séquence codant pour cette protéine et utilisation dans des compositions vaccinales.

**2. Revendications 17 et 19, toutes deux partiellement:**

Composition vaccinale contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'Homme contenant à titre de principe actif une protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

.soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme;

. soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie *in vivo* due au parasite correspondant;

. soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment;

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur; dans le cas non couvert par le sujet 1 d'une protéine ne relevant pas des revendications 2 à 13 ou 16.

**3. Revendications 20-22, 24, 40, 41, 45**

Production d'un anticorps spécifique reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaissant pas *Plasmodium vivax*; utilisation à des fins diagnostiques ou de purification, et hybridome sécrétant d'anticorps monoclonaux correspondants.

Le rapport de recherche complète a été établi.

**Obscurité :**

Dans la revendication 3, les termes "p42 correspondante produite dans les mêmes conditions" sont vagues et laissent un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles ils se réfèrent. De plus la syntaxe de cette revendication est équivoque ce qui introduit une ambiguïté quant à l'objet réel de la revendication. Il serait nécessaire de reformuler cette revendication pour éliminer toute incertitude.

**Incohérences:**

La revendication 23 concerne un "anticorps monoclonal selon la revendication 20 caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. vivax*. Or la revendication 20 caractérise l'anticorps concerné par le fait qu'il ne reconnaît pas *P. vivax*". Il y a par conséquent incohérence et cette revendication n'a pu être recherchée.

La revendication 44 concerne une "composition de vaccin selon la revendication 23". Or la revendication 23 se rapporte à un anticorps. Par conséquent l'objet de la revendication n'est pas clairement défini. La recherche a été effectuée en considérant qu'il s'agissait d'une composition de vaccin selon la revendication 43.

**Recherche incomplète :**

Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes :

1, 2, 4-22, 24-45

Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches complètes :

3, 23

This Page Blank (uspto)

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 CIB 6 C12N15/30 C12N15/86

C07K14/445 C07K16/20

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 74, no. 1, 20 Décembre 1995, pages 105-111, XP000603955 LONGACRE, S.: "The Plasmodium cynomolgi merozoite surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other Plasmodium species" cité dans la demande	1,13,25, 30,31,42
Y	voir page 107, colonne 1, ligne 4 - ligne 9  voir page 109, colonne 1, ligne 5 - ligne 11; figures 1,2  --- -/-	2,4-12, 16, 26-29,42

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 Août 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.09.97

 Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

**This Page Blank (uspto)**

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y id fr	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 Janvier 1994, pages 191-205, XP000603954 LONGACRE, S. ET AL.: "Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus" cité dans la demande	2,4-12, 16, 26-29,42
X	voir le document en entier	17,20
X id fr	WO 93 17107 A (MEDICAL RES COUNCIL) 2 Septembre 1993	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	voir le document en entier	1,13, 17-22, 24-42
X id fr	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 60, no. 2, 1 Janvier 1993, pages 303-310, XP000603763 CHAPPEL, J.A. & HOLDER, A.A.: "Monoclonal antibodies that inhibit Plasmodium falciparum invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1"	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	voir le document en entier	2,4-13, 16,19, 24-45
X id fr	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 2, 15 Juillet 1992, BALTIMORE US, pages 548-555, XP000605417 CHANG, S.P. ET AL.: "A carboxy-terminal fragment of Plasmodium falciparum gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth"	1,2,17, 18,42
Y id fr	EP 0 154 454 A (WELLCOME FOUND) 11 Septembre 1985	1,2,5,6, 12, 16-22, 24-38, 40-45
	voir page 2, alinéa 3 - page 13, alinéa 2; revendications; exemple 7	
	---	
	-/--	

**This Page Blank (uspto)**

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	<p>FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 2 Juin 1996, page A1117 XP000604872 ANGOV E ET AL: "CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT PLASMODIUM FALCIPARIUM MSP 1 C-TERMINAL FRAGMENT USING CONFORMATION-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES" voir abrégé</p> <p>-----</p>	20

This Page Blank (uspto)



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document Internationale No

PCT/FR 97/00290

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9317107 A	02-09-93	AU 3570493 A	13-09-93
		CA 2128109 A	02-09-93
		EP 0627004 A	07-12-94
		JP 7504321 T	18-05-95
		NZ 249208 A	26-03-96
-----			
EP 0154454 A	11-09-85	AU 592749 B	25-01-90
		AU 3904685 A	05-09-85
		GB 2154592 A	11-09-85
		IL 74409 A	26-08-94
		JP 2584733 B	26-02-97
		JP 61019490 A	28-01-86
		JP 6189772 A	12-07-94
		US 5597708 A	28-01-97
-----			

**This Page Blank (uspto)**

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D	18 MAY 1998
WIPO	PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

72

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B3044A - EG	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR97/00290	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14/02/1997	Date de priorité (jour/mois/année) 14/02/1996
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/30		
Déposant INSTITUT PASTEUR et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 24/07/1997	Date d'achèvement du présent rapport 14. 05. 98
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international Office européen des brevets D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0. Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé Pilat, D N° de téléphone (+49-89) 2399-8668



This Page Blank (uspto)

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR97/00290

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-41 version initiale

**Revendications, N°:**

1-45 version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/32-32/32 version initiale

**2. Les modifications ont entraîné l'annulation :**

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

**4. Observations complémentaires, le cas échéant :**

**III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n°s 3.23.

**This Page Blank (uspto)**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR97/00290

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications n°s en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
- ☒ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s 3,23 en question ne sont pas claires, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :  
**voir feuille séparée**
- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications	9,13-15,19,24-31,33-45
	Non : Revendications	1,2,4-8,10-12,16-18,20-22,32
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	9,13-15,19,24-31,33-45
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1,2,4-22,24-45
	Non : Revendications	

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**This Page Blank (uspto)**



**Section III:**

- 1) La revendication 3 est obscure. Les caractéristiques qui définissent la protéine ne peuvent être évaluées. L'inhibition de "la réactivité d'un antisérum humain immune avec la p42 correspondante"? "aussi bien que cette p42 elle-même"? sont des caractéristiques obscures.
- 2) La revendication 23 est obscure. Elle se réfère en effet à la revendication 20 qui ne reconnaît pas *P. vivax* alors que la caractéristique additionnelle de la revendication 23 est la reconnaissance spécifique de *P. vivax*.

**Section V:****1) Citations**

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1 Molecular and Biochemical Parasitology, vol 74, n°1 20/12/95 p105-111  
Longacre, S et al.
- D2 Molecular and Biochemical Parasitology, vol 64, n°2, 1/1/94, p.1991-205,  
Longacre, S. et al.
- D3 WO-A-9317107
- D4 Molecular and Biochemical Parasitology, vol 60, n°2, 1/1/93, p303-310,  
Chappel, J.A. et Holder, A.A.
- D5 EP-A-154454

**2) Priorité (Article 8 PCT)**

La revendication 1 de la présente demande se réfère à "une protéine dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons de la protéine 1 de surface (MSP-1) qui est infectieux pour des mammifères..." alors que le document de priorité fait uniquement référence à l'homme (document de priorité p.4 lignes 21-23).

La revendication 2 se réfère à "une protéine reconnue par des antisérums humains ... ou contre un Plasmodium homologue lorsqu'elle est à l'état non réduit ou dans un état réduit non irréversible, mais non reconnue ou peu reconnue par ces même antisérums lorsqu'elle est irréversible réduite" alors que le document de priorité fait uniquement référence à des protéines reconnues par des sérums humains formés contre le Plasmodium correspondant (document de priorité p.14 lignes 13-16).

La revendication 44 se réfère à "une composition de vaccin choisi parmi des mélanges suivant: ...". Aucun mélange cité dans ladite revendication n'est décrit

**This Page Blank (uspto)**

dans le document de priorité.

Enfin la revendication 45 se réfère à un hybridome CNCM I-1846. Aucun hybridome CNCM I-1846 n'est mentionné dans le document de priorité.

Par conséquent, les expressions ci-dessus, qui ne sont pas supportées par le contenu du document de priorité, sont des modifications qui étendent l'objet de la demande au-delà de son contenu original. Les revendications qui les contiennent ne jouissent donc pas du droit de priorité associé au document FR96-01822 (14.02.96). Le document P(x) cité dans le rapport de recherche international peut donc être considéré comme faisant partie de l'art antérieur par rapport à ces revendications.

### 3) Nouveauté (Article 33 (2) PCT)

- 3.1) Une protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle d'un fragment C-terminal de 19 kDa de MSP-1 d'un parasite du type Plasmodium et infectieux pour des mammifères a été décrite dans le document D3 (voir revendication 3 et Fig 4 bas de page "MSP1<sub>19</sub>"). La séquence polypeptidique provient d'une souche Plasmodium falciparum. Cette souche est infectieuse pour l'homme.  
D3 décrit, l'utilisation d'une partie de ce fragment ou peptide (voir D3, revendication 1 ou 2) ayant la séquence d'acide aminé décrite à la Fig.6 (P. yoelii) afin d'induire une réponse immune (voir exemple 2 et Table 1).  
La revendication 1 n'est donc pas nouvelle. La même conclusion s'applique aux revendications 4 à 8 et 12.
- 3.2) D4, qui reprend les mêmes constructions que D3, montre qu'un sérum immun de lapin, obtenu à l'aide de P. falciparum MSP-1, est capable de les détecter (voir D4 Fig.4). Le simple fait de caractériser une protéine par des paramètres qui n'ont pas été mesurés, comme par exemple, pour la revendication 2, la reconnaissance des protéines par un antisérum humain, ne rend pas cette protéine nouvelle.
- 3.3) D3 montre qu'après dialyse du fragment MSP-EGF combiné, le composé est soluble dans PBS (voir D3 p.17 1er paragraphe). Les revendications 10 et 11 ne sont pas nouvelles.
- 3.4) D3 décrit la production de polypeptide selon la revendication 1 (voir D3, Fig. 1 et 2 et point 3.1 ci-dessus) fusionné à un groupe GST ou autre (voir D3, p.6, 2ème paragraphe ou p.14, 1er paragraphe). La revendication 16 n'est donc pas nouvelle.
- 3.5) Des vaccins comprenant les protéines décrites au point 3.1 ci-dessus sont

**This Page Blank (uspto)**

connus dans l'art antérieur (voir D3; revendications 11 et 12, et table 2). Les revendications 17 et 18 sont pas nouvelles.

- 3.6) Des anticorps monoclonaux reconnaissant le fragment p19 de la protéine MSP-1 d'un *Plasmodium falciparum*, qui est infectieux pour l'homme, ont été décrits dans D4 (voir p.306, lignes 12-16 et Fig.2 à 4). Les revendications 20 à 22 ne sont donc pas nouvelles.

Le fait que les anticorps des revendications 20 à 23 ne reconnaissent pas *P. vivax*, ne peut être considéré, car ce paramètre pourrait être satisfait, si ce paramètre était mesuré.

- 3.7) Une séquences d'ADN codant pour MSP-1 de *P. falciparum* est décrit dans l'art antérieur (voir D5, Fig.1 A-I). La revendications 32 n'est donc pas nouvelle.

#### 4) **Activité inventive (Article 33 (3) PCT)**

- 4.1) Le document D2 dévoile (Fig.2) des constructions comprenant la séquence d'acide aminé de *P. vivax* (voir aussi D2, p.193, 3ème paragraphe). L'homme de métier afin d'obtenir une protéine ancrée à la surface de la cellule Sf9 (cellule d'insecte) comprenant un groupe glycosylphosphatidylinositol (GPI) (voir D2, p.197, col.2, lignes 4-9), provenant d'une souche de *Plasmodium* autre que celle provenant de *P.vivax*, échangera la séquence *P. vivax* (PV19A) par une séquence correspondante de *P. falciparum*. Des résultats indiquent qu'une telle séquence (GPI) est également présente dans *P. falciparum* (voir D2, p.197, col.2, 2ème paragraphe). Aucune activité inventive ne peut être reconnue pour la revendication 9.

- 4.2) Le document D2 dévoile (Fig.2) des constructions comprenant la séquence d'acide aminé de *P. vivax* (voir aussi D2, p.193, 3ème paragraphe). L'homme de métier afin d'obtenir une protéine provenant d'une souche de *Plasmodium* autre que celle provenant de *P.vivax*, échangera la séquence *P. vivax* (PV19A ou PV19S) par la séquence correspondante de *P. cynomolgi*. Le document D1 dévoile (Fig.1) la séquence d'acide aminé de *P. cynomolgi*. De même, afin d'obtenir un fragment similaire à celui décrit dans D3, c-à-d un fragment p19 ou une partie de ce fragment contenant au moins un motif EGF (voir ci-dessus point 3.1), l'homme de métier remplacerait la séquence de *P. falciparum* par celle correspondante de *P. cynomolgi*. Aucune activité inventive ne peut être reconnue pour la revendication 13.

- 4.3) Des oligomères, des vaccins contenant des oligomères, un procédé de diagnostic utilisant des anticorps (voir point 3.5 ci-dessus), des vecteurs du type baculovirus (voir D2, titre et p.192, col.1 dernier paragraphe jusqu'à col.2 ligne 11) ayant une teneur en G et C comprise 40 à 60 (voir D1, p.107, lignes 4-9), des vecteurs de type baculovirus contenant une séquence nucléotidique dépourvue de leur

**This Page Blank (uspto)**

extrémité 3'terminale hydrophobe (voir D2, Fig.2 PV19 S), des hôtes transfectés par de tels vecteurs (D2, p.192, col.2 1er paragraphe), des vecteurs PvMSP1-p19A, PvMSP1-p19S, pfMSP1-p19A, PfMSP1-p19S ou PcMSP1-p19S (voir D2, Fig.2), des séquences d'acide aminé (voir D1, p.106 Fig.1; D3, Fig.1 Fig.2 Fig.6), des ADN qui possèdent une séquence signal *P. vivax*, des ADN qui possèdent une région codant pour une séquence d'acide aminé d'ancrage (voir D2, p.194, lignes 8-11 et Fig 2. PV19A), des hybridomes ou plus précisément un hybridome reconnaissant *P. falciparum* comme CNCM-I-1846, des procédés de séparations, l'utilisation de protéines pour la préparation de vaccins, des vaccins caractérisés par un mélange de principe actifs sont des applications ou des modes de réalisations connus dans l'art antérieur.

L'association de ces applications ou modes de réalisation, revendiqués dans la présente demande, à des objets qui ne satisfont pas aux critères 33(2) ou 33 (3) PCT (voir points 3 ou 4 ci-dessus) est un choix que l'homme du métier aurait effectué selon les cas d'espèce. Les revendications 14-15, 19, 24-31 et 33-45, ne sont pas inventives.

This Page Blank (uspto)





## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/30, 15/86, C07K 14/445, A61K 39/015, C07K 16/20, G01N 33/569, C12N 5/24</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 97/30158</b> <b>(43) Date de publication internationale: 21 août 1997 (21.08.97)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/00290 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 14 février 1997 (14.02.97)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/01822 14 février 1996 (14.02.96) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf FR US):</b> NEW YORK UNIVERSITY [US/US]; Medical Center, 550 First Avenue, New-York, NY 10016 (US).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> LONGACRE-ANDRE, Shirley [FR/FR]; 11, rue d'Assas, F-75006 Paris (FR). ROTH, Charles [US/FR]; c/o Agnès Rimond, 18, rue Geneviève-Couturier, F-92500 Rueil-Malmaison (FR). NATO, Faridabano [FR/FR]; 65, rue Mirabeau, F-92160 Antony (FR). BARNWELL, John, W. [US/US]; Apartment 10D, 3 Washington Square Village, New York, NY 10012 (US). MENDIS, Kamini [LK/LK]; Kynsey Road, P.O. Box 271, Columbo 8 (LK).		<b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasserand S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, CN, JP, KP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title: RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF PLASMODIUM MSP-1</b> <b>(54) Titre: PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT C-TERMINAL DE MSP-1 DE PLASMODIUM</b>  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a recombinant protein fabricated in a baculovirus system, of which the essential constitutive polypeptide sequence is that of a C-terminal fragment of 19 kilodalton (p19) of the surface protein 1 (protein MSP-1) of the merozoite parasite of the <i>Plasmodium</i> type, particularly <i>Plasmodium falciparum</i>, which is infectious for humans, said C-terminal fragment remaining normally anchored at the surface of the parasite at the end of its penetration phase into human erythrocytes, in the occurrence of an infectious cycle. Said recombinant protein is applicable to the production of vaccines against malaria.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne une protéine recombinante, fabriquée dans un système à baculovirus, dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type <i>Plasmodium</i>, en particulier <i>Plasmodium falciparum</i>, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux. Cette protéine recombinante est applicable à la production de vaccins contre la malaria.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT C-TERMINAL DE MSP-1 DE PLASMODIUM

L'invention concerne de nouveaux principes actifs de vaccins dérivés de la protéine majeure de surface de formes mérozoïtes d'un  
10 *Plasmodium* infectieux pour des mammifères, notamment l'homme, plus généralement connue sous la désignation MSP-1.

Cette protéine a déjà fait l'objet d'études nombreuses. Elle est synthétisée dans le stade schizonte des parasites du type *Plasmodium*, notamment *Plasmodium falciparum*, et est exprimée sous forme de l'un des  
15 constituants majeurs de la surface des mérozoïtes aussi bien pendant le stade hépatique que pendant le stade érythrocytaire du paludisme (1, 2, 3, 4). En raison du caractère prédominant et de la conservation dans toutes les espèces de *Plasmodium* connues de cette protéine, il a été suggéré qu'elle pourrait représenter un candidat pour la constitution de vaccins  
20 anti-paludiques (5, 6).

Il en a encore été de même pour des fragments de cette protéine, particulièrement des produits naturels de clivage dont l'on observe la formation, par exemple au cours de l'invasion par le parasite des érythrocytes de l'hôte infecté. Parmi, ces produits de clivage, on relèvera le  
25 fragment C-terminal ayant un poids moléculaire de 42 kDa (7,8) qui est à son tour clivé une nouvelle fois en un fragment N-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 33 kDa et en un fragment C-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 19 kDa (9) qui reste normalement fixé à la membrane du parasite au terme des  
30 modifications dont il est lui-même l'objet, par l'intermédiaire de groupes du type glycosylphosphatidylinositol (GPI) (10, 11).

On le retrouve encore au stade anneau précoce du cycle de développement intraérythrocytaire (15, 16), d'où les observations qui ont été faites que ce fragment de 19 kDa pourrait jouer un rôle non encore connu, mais sans doute essentiel dans les processus réinvasifs. De là  
5 découlent les hypothèses déjà formulées dans le passé que cette protéine pourrait constituer une cible particulièrement efficace pour d'éventuels vaccins.

Il sera entendu que les références souvent faites dans ce qui suit à des protéines p42 et p19 issues d'un certain type de *Plasmodium*  
10 s'entendent comme se rapportant aux produits de clivage C-terminaux correspondants de la protéine MSP-1 de ce *Plasmodium*, ou, par extension, à des produits contenant sensiblement les mêmes séquences en acides aminés, obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique selon les techniques classiques, par exemple par synthétiseur de  
15 type « Applied System » ou par synthèse sur phase solide de type « Merrifield ». Pour la commodité du langage, les références à des « p42 recombinantes » et des « p19 recombinantes » se rapportent à des « p42 » et « p19 » obtenues par des techniques comportant au moins une étape de génie génétique.

20       Devant la difficulté d'obtenir des quantités importantes de parasites pour *P.falciparum* et l'impossibilité de cultiver *P.vivax in vitro*, il est devenu évident que le seul moyen de produire un vaccin antipaludique nécessite un recours aux techniques permettant l'utilisation des peptides ou protéines recombinantes. Mais, le MSP-1 est très difficile à produire en  
25 entier à cause de sa grande taille d'environ 200 kDa, un fait qui a conduit les chercheurs à s'intéresser à la partie C-terminale dont la fonction, encore inconnue, est vraisemblablement la plus importante.

Au titre, des protéines recombinantes concernant la partie C-terminale de MSP-1 de *P.falciparum*, qui ont été produites et testées chez  
30 le singe (12, 40, 41) on mentionnera :

- une p19 fusionnée avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* (40),
- une p42 fusionnée avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* (12),
- 5 • une p19 fusionnée avec un polypeptide issu d'une anatoxine tétanique et porteur d'épitopes de cellules T auxiliaires produites dans *S.cerevisiae* (12),
- une p42 produite dans un système baculovirus (41).

10 Une composition contenant la protéine de fusion p19 avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* en association avec alun ou liposomes n'a pas exercé d'effet protecteur sur aucun des six singes *Aotus nancymai* vaccinés (40).

15 Une composition contenant la protéine de fusion p42 avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* en association avec un adjuvant complet de Freund n'ont pas exercé d'effet protecteur dans les deux types de singes *Aotus* (*A.nancymai* et *A.vociferans*) auxquels elles avaient été administrées. La protéine p19 produite dans *S.cerevisiae* a exercé un effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.nancymai*  
20 (12). Par contre elle n'a pas exercé d'effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.vociferans*.

Certains chercheurs (Chang et al.) ont également rapporté des essais d'immunisation réalisés chez le lapin avec une protéine recombinante p42 produite dans un système baculovirus et contenant une  
25 séquence d'acides aminés en commun avec *P.falciparum* (18). Ainsi ces derniers auteurs indiquent-ils que cette p42 recombinante se comporte chez le lapin sensiblement de la même façon que la protéine MSP-1 recombinante entière (gp195). Cette protéine p42 en association avec un adjuvant complet de Freund a fait l'objet d'un essai de vaccination dans un  
30 primate non-humain susceptible à l'infection par *P.falciparum*, *Aotus lemurinus grisemembra* (40). Les résultats montrent que 2 sur 3 animaux

ont été complètement protégés et le troisième, bien que montrant une parasitémie semblable aux contrôles, avait une période latente plus longue. Il est néanmoins hasardeux de conclure au caractère protecteur chez l'homme des anticorps ainsi induits à l'encontre des parasites eux-mêmes. Rappelons en effet qu'il n'existe pas actuellement de modèles expérimentaux très satisfaisants chez le primate pour *P. vivax* et *P. falciparum*. Le modèle *Saimiri*, qui a été développé pour *P. falciparum* et *P. vivax*, et le modèle *Aotus* pour *P. falciparum*, sont des systèmes artificiels, nécessitant l'adaptation de souches de parasite et souvent la splénectomie des animaux pour obtenir des parasitémies significatives. En conséquence, les résultats de vaccination provenant de ces modèles ne peuvent avoir qu'une valeur prédictive limitée pour l'Homme.

On peut de toute façon aussi s'interroger sur ce que serait un taux réel de vaccination susceptible d'être éventuellement obtenu avec de telles protéines recombinantes, compte tenu de la constatation -rapportée plus loin- qui a été faite de la présence dans les p42 issues des *Plasmodiums* de la même espèce, et plus particulièrement dans les p33 correspondantes, de régions hypervariables qui rendraient aléatoires en de nombreux cas l'efficacité immunoprotectrice des anticorps induits chez des personnes vaccinées par une p42 issue d'une souche de *Plasmodium* à l'encontre d'une infection par d'autres souches de la même espèce (13).

On peut même supposer que le polymorphisme important de la partie N-terminale du p42 joue un rôle significatif dans l'échappement immunitaire, souvent observé pour ce type de parasites.

La présente invention a pour objectif la production de protéines recombinantes vaccinales échappant à ces difficultés, dont l'effet protecteur est vérifiable dans des modèles expérimentaux réellement significatifs, ou même directement chez l'homme.

L'invention concerne plus particulièrement des compositions vaccinales contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif une protéine recombinante

glycosylée ou non, dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide immunologiquement équivalent à ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant, de préférence, la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

La présence de ces épitopes conformationnels pourrait jouer un rôle important dans l'efficacité protectrice du principe actif de vaccins. On les retrouve tout particulièrement dans les principes actifs présentant par ailleurs les autres caractéristiques définies ci-dessus, lorsqu'ils ont été produits dans un système vecteur baculovirus. S'il en est besoin, il est mentionné ci-après que par l'expression « système de vecteur baculovirus » on entend l'ensemble que constitue le vecteur type baculovirus lui-même et les lignées cellulaires, notamment cellules d'insectes transfectables par un baculovirus modifié par une séquence à transférer dans ces lignées cellulaires avec pour résultat l'expression de cette séquence transférée. Des exemples préférés de ces deux partenaires du système baculovirus, ont été décrits dans l'article de Longacre et al. (19). C'est le même système qui a été utilisé dans les exemples qui suivent. Il va naturellement de soi que des variants, tant du baculovirus

que des cellules infectables par ce baculovirus peuvent être utilisés en lieu et place de celui qui a été choisi.

En particulier ladite protéine recombinante est reconnue par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant ou contre un *Plasmodium* homologue lorsqu'elle est à l'état non réduit ou dans un état réduit non irréversible, mais non reconnue ou peu reconnue par ces mêmes antisérums, lorsqu'elle est irréversiblement réduite.

Le caractère instable en milieu réducteur de ces épitopes conformationnels peut être mis en évidence, notamment par le test décrit plus loin dans les exemples, notamment en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. De même sont indiquées dans des exemples ci-après des conditions expérimentales applicables à l'obtention d'une réduction irréversible des protéines conformes à l'invention.

De ce point de vue, la protéine recombinante produite par S. Longacre et al. (14) peut être mise en oeuvre dans de tels compositions. Il est rappelé que S. Longacre et al. réussirent à produire une p19 recombinante issue de la MSP-1 de *P. vivax* dans un système vecteur à baculovirus contenant une séquence nucléotidique codant pour la p19 de *Plasmodium vivax*, en particulier par transfection de cultures de cellules d'insectes [lignée de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)] avec des baculovirus vecteurs contenant, sous le contrôle du promoteur de la polyhédrine, une séquence codant pour les fragments peptidiques définis ci-dessous, dont les séquences étaient placées dans l'ordre suivant dans le vecteur baculovirus utilisé :

- fragment 5'-terminal de 35 paires de bases de la séquence signal de la polyhédrine, dont avait été muté (en ATT) le codon méthionine d'initiation de l'expression de cette protéine;
- un fragment 5'-terminal nucléotidique codant pour un peptide de 32 acides aminés correspondant à la partie N-terminale de MSP-1, y compris le peptide signal de MSP-1 ;



- soit une séquence nucléotidique codant pour la p19, soit une séquence codant pour la p42 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium vivax*, ces séquences étant aussi, selon le cas, soit pourvues (formes « ancrées »), soit dépourvues (formes solubles) des régions d'extrémité 3' de ces séquences de nucléotides dont les produits d'expression C-terminaux extrêmes sont réputés jouer un rôle essentiel dans l'ancrage de la protéine finale p19 sur la membrane du parasite ;
- 2 codons stop TAA.

Pour la p42, les séquences dérivées de la région C-terminale de MSP-1 s'étendaient par conséquent de l'acide aminé Asp 1325 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble) et pour la p19, les séquences s'étendaient de l'acide aminé Ile 1602 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble), étant entendu que les séquences en acides aminés complètes de p42 et p19 dont les acides aminés initiaux et terminaux ont été indiqués dans ce qui précède découlent du gène de l'isolat Belem de *P.vivax* qui a été séquencé (20).

Des résultats semblables ont été obtenus en mettant en oeuvre dans les mêmes systèmes de vecteurs des séquences nucléotidiques codant pour la p42 et la p19 de *Plasmodium cynomolgi*. *P.cynomolgi* présente un double intérêt : c'est une espèce parasitaire très proche de *P.vivax* qui est infectieuse pour le macaque. Il peut aussi infecter l'Homme. On a également accès à des hôtes naturels de *P.cynomolgi*, les singes rhésus et les singes toques, pour tester l'efficacité de protection du MSP-1 de *P.cynomolgi* dans des systèmes naturels. Le singe rhésus est considéré comme une des espèces les plus représentatives des réactions immunitaires chez l'Homme.

En particulier, on a obtenu d'excellents résultats dans des essais de vaccination réalisés chez le singe toque avec deux polypeptides recombinants : la p42 et, surtout, la p19 solubles, dérivées de *P.cynomolgi*, respectivement produites dans un système baculovirus et purifiées sur

colonne d'affinité avec des anticorps monoclonaux reconnaissant les régions correspondantes de la protéine MSP-1 native. Les observations suivantes ont été faites : les six singes immunisés avec le seul p19 (trois singes) et le 19 et p42 ensemble (3 singes) ont tous témoigné d'une  
5 immunité presque stérile après infection d'épreuve. Les résultats obtenus chez les trois singes immunisés avec le p42 ont été moins significatifs. Deux d'entre eux se sont comportés comme les précédents, mais si le troisième a manifesté une parasitémie moins importante que des témoins immunisés avec un tampon PBS en présence de l'adjuvant de Freund (3  
10 singes) ou non immunisés (3 singes), elle n'en n'était pas moins patente.

Une deuxième infection d'épreuve montrant que les singes ayant reçu la p19 seule étaient protégés au moins pendant six mois. Un deuxième essai de vaccination avec la p19 en association avec alun dans ce système (*P.cynomolgi*/singe toque) a démontré une protection  
15 significative pour 2 des 3 singes. C'est la première fois que la MSP-1 ou un autre antigène recombinant a démontré un effet protecteur en présence d'alun (42).

Les résultats des essais particulièrement efficaces réalisés chez le macaque avec des polypeptides recombinants produits dans un système  
20 baculovirus mettant en oeuvre une p19 recombinante de *P.cynomolgi*, établissent que des polypeptides recombinants contenant respectivement des p19 recombinantes issus d'autres *Plasmodiums* doivent se comporter de la même manière. Ils sont « plus parlants » pour le paludisme chez l'Homme que les résultats d'essais réalisés avec *P.vivax* ou *P.falciparum*  
25 dans leurs « hôtes artificiels ».

Les protéines recombinantes de baculovirus, dérivées d'une partie C-terminale de MSP-1 (p19), ont un effet protecteur antipaludique très significatif dans un système naturel, qui constitue le modèle d'évaluation de l'effet protecteur de MSP-1 le plus représentatif pour l'homme.

30 L'effet protecteur obtenu pourrait être d'autant meilleur que la forme p19 est dépourvue de la région hypervariable de la partie N-terminale du

p42, dont l'effet peut être délétère dans des situations naturelles dans lesquelles le sujet vacciné est confronté à un polymorphisme important. Aussi la p19 semble posséder des épitopes spécifiques qui ne sont pas présents dans la p42.

5           Le fragment C-terminal de 19 kDa dont la séquence est présente dans le principe actif du vaccin peut être limité à la séquence de la p19 elle-même, en l'absence de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence de p19 dans la protéine MSP-1 correspondante. Il va néanmoins de soi que la séquence polypeptidique constitutive  
10   essentielle du principe actif peut encore comporter une séquence polypeptidique du côté C-terminal appartenant au fragment N-terminal de 33 kDa (p33) encore associée à la p19 dans la p42 correspondante, avant le clivage naturel de cette dernière, et cela chaque fois que la présence de ce fragment n'est pas de nature à modifier les propriétés immunologiques  
15   du principe actif du vaccin. Comme cela sera vu plus loin, notamment à propos de la description des exemples, les séquences C-terminales de la p33 de souches diverses d'une même espèce de *Plasmodium* (voir la partie C-terminale des séquences peptidiques de la « région III » de la figure 4), présentent aussi encore un degré d'homologie ou de  
20   conservation substantielle de la séquence, par exemple de l'ordre de 80% au moins, dans différentes variétés de *Plasmodiums* infectieux pour l'homme, de sorte qu'elles ne sont pas de nature à modifier fondamentalement les propriétés vaccinales du principe actif (dont la séquence correspond à la région IV) de la figure 4, en particulier dans  
25   l'hypothèse qui découle de cette figure le site de clivage présumé entre la p19 et la région III de la p33 se situe entre les résidus leucine et asparagine dans une région particulièrement bien conservée (LNVQTQ).

          Normalement la séquence polypeptidique C-terminale de la p33, lorsqu'elle est présente, comprend moins de 50 résidus d'acides aminés,  
30   voire même moins de 35, ou même moins de 10 résidus d'acides aminés.

A l'inverse, la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe actif de vaccin peut ne pas comporter la totalité de la séquence codant pour la p19, naturellement sous réserve que cette dernière conserve la capacité d'induire des anticorps protecteurs contre le parasite.

- 5 En particulier la susdite « partie de fragment a un poids moléculaire de 10 à 25 kDa, notamment de 10 à 15 kDa. De préférence, cette partie de fragment polypeptidique contient au moins l'une des deux régions EGF (abréviation de l'expression anglaise « Epidermal Growth Factor »).

- 10 Il est clair que l'homme du métier est à même de faire la différence entre les fragments actifs et ceux qui cesseraient de l'être, notamment de façon expérimentale en produisant des vecteurs modifiés contenant des insérats issus de la p19 de longueurs différentes, respectivement isolés à partir des fragments obtenus à partir de la séquence codante pour la p19, par réaction avec des enzymes de restriction appropriés, ou encore par
- 15 des enzymes exonucléolytiques qui auraient été maintenus au contact du fragment codant pour la p19 pendant des temps variables ; la capacité des produits d'expression de ces insérats dans des cellules eucaryotes correspondantes, notamment des cellules d'insectes, transformées par les vecteurs modifiés correspondants, à exercer un effet protecteur, pouvant
- 20 alors être testée, notamment dans les conditions expérimentales qui seront décrites plus loin, à propos des exemples. En particulier, les produits d'expression de ces insérats doivent être aptes à inhiber une parasitémie induite *in vivo* par le parasite correspondant entier.

- De même, l'invention inclut toutes compositions vaccinales dans
- 25 lesquelles la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe actif serait constitué d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par la p19 ou au fragment tel qu'il vient d'être défini, dès lors que l'addition, la délétion ou la substitution dans sa séquence de certains
- 30 acides aminés par d'autres n'entraîneraient pas une modification importante de la capacité du peptide ainsi modifié -ci-après appelé

« peptide immunologiquement équivalent »- à aussi inhiber la susdite parasitémie.

Le fragment de la p19 peut naturellement aussi être associé que ce soit du côté N-terminal ou du côté C-Terminal ou par l'intermédiaire d'une  
5 liaison peptidique à un autre fragment de protéine plasmodiale ayant un potentiel vaccinant comme par exemple une protéine (« Duffy Binding Protein » de *P. vivax* (29) ou EBA-175 de *P. falciparum* (30) et (31) dont une région est spécifiquement riche en cystéine), sous réserve que ne soit pas altérée, au contraire amplifiée, sa capacité d'inhiber une parasitémie  
10 normalement introduite in vivo par le parasite correspondant.

Le fragment codant pour la p19 ou une partie de celle-ci, peut contenir également, en amont de l'extrémité N-terminale de p19, une séquence peptidique encore différente, par exemple à un fragment C-terminal du peptide signal utilisé, tel que celui de la protéine MSP-1.  
15 Cette séquence comprend de préférence moins de 50 acides aminés, par exemple de 10 à 40 acides aminés.

Ces observations s'étendent de la même façon à des p19 issues d'autres *Plasmodium*, en particulier *P. falciparum*, l'espèce dominante des parasites, responsable d'une des formes les plus graves de paludisme.

20 Mais les techniques rappelées ci-dessus pour la production dans un système de baculovirus d'une p19 recombinante issue de *P. vivax* ou *P. cynomolgi* sont difficilement transposables telles quelles à la production d'une p19 recombinante de *P. falciparum* avec un rendement satisfaisant, ne fût-ce que pour obtenir des quantités appréciables autorisant la  
25 réalisation d'essais d'immunoprotection.

L'invention fournit également un procédé remédiant en grande partie à cette difficulté. Il devient aussi possible d'obtenir des rendements beaucoup plus importants en p19 de *P. falciparum* -et d'autres *Plasmodiums* lorsque l'on rencontre des difficultés semblables- en mettant  
30 en oeuvre une séquence nucléotidique synthétique de substitution à la séquence nucléotidique naturelle codant pour la p19 de *Plasmodium*

*falciparum* dans un vecteur d'expression d'un système baculovirus, cette séquence nucléotidique synthétique codant pour la même p19, mais étant caractérisée par une proportion de nucléotides G et C plus élevée que dans la séquence nucléotidique naturelle.

5           En d'autres termes, l'invention découle de la découverte que l'expression dans un système baculovirus d'une séquence nucléotidique codant pour une p19, était apparemment liée à une compatibilité améliorée des codons successifs de la séquence nucléotidique à exprimer avec la  
10 « machinerie cellulaire » des cellules hôtes transformables par des baculovirus, à l'instar de ce qui est observé pour les séquences nucléotidiques naturelles normalement contenues dans ces baculovirus et exprimées dans les cellules hôtes infectées ; d'où la mauvaise expression, sinon parfois l'absence totale d'expression d'une séquence nucléotidique native de *P.falciparum* ; d'où également une explication possible à  
15 l'expression plus efficace observée de la p19 de *P.vivax* dans un système baculovirus par Longacre et al. (14) et, comme les inventeurs l'ont aussi constaté, de la séquence de *P.cynomolgi* à partir des séquences nucléotidiques p19 natives correspondantes, en raison de leurs teneurs relatives en nucléotides G et C beaucoup plus élevées que celles des  
20 séquences nucléotidiques natives codant pour les p19 de *P.falciparum*.

L'invention concerne donc aussi, plus généralement, un vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence  
25 nucléotidique codant pour un peptide signal exploitable par un système baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence nucléotidique en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et code pour la séquence peptidique :

30           ◦ soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux

pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;

- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide immunologiquement équivalent dérivé du susdit fragment peptidique C-terminal (p19) ou de la susdite partie de fragment peptidique par addition, délétion ou substitution d'acides aminés n'entraînant pas une modification importante de la capacité de ce peptide immunologiquement équivalent à induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale semblable à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant le cas échéant une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée. Cette séquence peut être obtenue par construction d'un gène synthétique dans lequel les codons naturels ont été changés par des codons riches en G/C sans que leur traduction soit modifiée (maintien de la séquence peptidique).

En l'occurrence ladite séquence nucléotidique, fournie par un ADN synthétique, peut présenter au moins 10% de codons modifiés par rapport à la séquence du gène ou du cDNA naturel tout en conservant les caractéristiques de la séquence naturelle traduite, c'est-à-dire le maintien de la séquence en amino-acides.

Cela étant, on n'exclut pas que cette teneur en nucléotides G et C pourrait être davantage accrue, dès lors que les modifications qui en résulteraient quant à la séquence en acides aminés du peptide recombinant -ou peptide immunologiquement équivalent-produit n'entraîneraient pas une perte des propriétés immunologiques, voire

protectrices, des protéines recombinantes formées, notamment dans les essais qui seront illustrés plus loin.

Ces observations s'appliquent naturellement à d'autres *Plasmodium* infectieux pour l'homme, en particulier dès lors que des séquences  
5 nucléotidiques natives codant pour les p19 correspondantes, auraient des teneurs en nucléotides T et A difficilement compatibles avec une expression efficace dans un système baculovirus.

La séquence codant pour le signal utilisé peut être celle normalement associée à la séquence native du *Plasmodium* concerné.  
10 Mais elle peut également être issue d'un autre *Plasmodium*, par exemple *P.vivax* ou *P.cynomolgi* ou d'un autre organisme s'il est susceptible d'être reconnu en tant que signal dans un système baculovirus.

La séquence codant pour la p19 ou un fragment de celle-ci au sein du vecteur considéré est, le cas échéant, dépourvue de la séquence  
15 d'ancrage de la protéine native au parasite dont elle est issue, cas dans lequel la protéine exprimée est en général excrétée dans le milieu de culture (forme soluble). Il est d'ailleurs remarquable à cet égard que dans les conditions de l'invention, les formes solubles et ancrées de protéines recombinantes produites, en particulier lorsqu'elles sont issues de  
20 *P.falciparum* ou *P.cynomolgi* ou *P.vivax*, ont tendance à former des oligomères, cette propriété pouvant être à l'origine des immunogénicités accrues des protéines recombinantes formées.

L'invention concerne tout autant les vecteurs dans lesquels la séquence codante contient la séquence d'extrémité 3' terminale codant  
25 pour la séquence d'extrémité C'-terminale hydrophobe de la p19 et qui est normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine native à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée. Cette région d'extrémité 3'-terminale peut d'ailleurs être hétérologue vis-à-vis de la séquence codant pour la partie soluble de p19, par exemple  
30 correspondre à la séquence 3'-terminale issue de *P.vivax* ou d'un autre organisme dès lors qu'elle code pour une séquence d'ancrage de



l'ensemble de la protéine recombinante produite à la membrane de l'hôte cellulaire du système baculovirus mis en oeuvre. A titre d'exemple de telles séquences d'ancrage on cite la GPI de l'antigène CD59 exprimable dans des cellules d'insectes du type *Spodoptera frugiperda* (32) ou la GPI d'une  
5 protéine humaine CD14 (33).

L'invention concerne naturellement aussi les protéines recombinantes, ces protéines comportant des épitopes conformationnels reconnus par des sérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

10 D'une façon générale, l'invention concerne également toute protéine recombinante du type indiqué ci-dessus, dès lors qu'elle comporte des épitopes conformationnels tels que produits dans le système baculovirus, notamment ceux qui se trouvent être instables en milieu réducteur.

L'invention concerne naturellement lesdites protéines  
15 recombinantes, qu'elles soient sous la forme dite soluble ou sous la forme pourvue d'une région d'ancrage, en particulier aux hôtes cellulaires mis en oeuvre dans le système baculovirus.

Entrent également dans le champ de l'invention, les oligomères produits spontanément dans les systèmes baculovirus utilisés ou produits  
20 a posteriori, en ayant recours à des techniques classiques d'oligomérisation de protéines. La technique couramment utilisée met en oeuvre le glutaraldéhyde. Mais tout système classique de pontage entre des fonctions respectivement amine et carboxyle, telles qu'on les retrouvent dans les protéines pourra également être utilisé. A titre  
25 d'exemples, on peut mettre en oeuvre l'une quelconque des techniques décrites dans la demande de brevet européen 0602079.

Par « oligomère » on entend une molécule contenant de 2 à 50 unités monomère, chacune de ces unités monomère contenant la p19 ou un fragment de celle-ci, tel que défini ci-dessus, capable de former un  
30 agrégat. L'invention porte également sur tout produit de conjugaison entre une p19 ou fragment de p19 tel que défini ci-dessus, d'une part, et une

molécule porteuse –par exemple une polylysine-alanine– utilisable pour la production des vaccins, d'autre part, par l'intermédiaire de liaisons covalentes ou non. Les compositions vaccinales les mettant en oeuvre font également partie de l'invention.

- 5 L'invention concerne également les compositions de vaccins mettant en oeuvre ces protéines recombinantes oligomères ou conjugués, y inclus d'ailleurs les protéines issues de *Plasmodium vivax*, ces observations s'étendant également aux oligomères de ces protéines recombinantes.

Font également partie de l'invention les compositions dans  
10 lesquelles les protéines recombinantes susmentionnées sont associées à un adjuvant, par exemple un alun. Les protéines recombinantes comportant l'extrême région C-terminale permettant leur ancrage à la membrane des cellules dans lesquelles elles sont produites sont avantageusement utilisées en combinaison avec des lipides aptes à former  
15 des liposomes et appropriés à la production de vaccins. Sans qu'il y ait eu lieu de s'y limiter, on peut avoir recours aux lipides décrits à cet effet par exemple dans l'ouvrage intitulé « Les liposomes aspects technologique, biologique et pharmacologique » de J. Delattre et al., édition INSERM, 1993.

- 20 La présence de la région d'ancrage dans la protéine recombinante, qu'il s'agisse d'une région d'ancrage homologue ou hétérologue vis-à-vis de la partie vaccinale proprement dite, est de nature à favoriser la production d'anticorps cytophiles, notamment du type IgG<sub>2a</sub> et IgG<sub>2b</sub> chez la souris qui pourraient avoir une activité protectrice particulièrement élevée,  
25 au point que l'on pourrait se dispenser d'associer les principes actifs de vaccins ainsi constitués avec des adjuvants autres que les lipides utilisés pour la constitution des formes liposomiques. Il s'agirait là d'un avantage important, puisque les liposomes peuvent être lyophilisés dans des conditions permettant leur stockage et leur transport, sans que des  
30 chaînes de froid ne soient alors indispensables.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'exemples de protéines recombinantes entrant dans le cadre de l'invention et des conditions dans lesquelles elles peuvent être produites, sans que ces exemples soient de nature à limiter la portée de l'invention.

**Description de la construction PfMSP1<sub>p19</sub>S (soluble) (p19 soluble issue de *P.falciparum*)**

La construction recombinante PfMSP1<sub>p19</sub>S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de base de la séquence leader et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met<sub>1</sub> à Asp<sub>32</sub> (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par le gène synthétique, décrit dans Figure 1, codant le *Plasmodium falciparum* MSP1<sub>p19</sub> de Asn<sub>1613</sub> à Ser<sub>1705</sub> (isolat Uganda-Palo Alto ; Chang et al. 1988. Exp. Parasitol. 67,1). La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules infectées.

De la même façon et à des fins de comparaisons, on a produit une construction recombinante dans des conditions semblables à celles utilisées pour la production de la p19 ci-dessus, mais en travaillant avec une séquence codante consistant en une copie directe de l'ADN correspondant de la souche *P.falciparum* (FUP) décrite par Chang et al., Exp. Parasit. 67,1; 1989. La copie de ce gène naturel (s'étendant de l'asparagine 1613 à la sérine 1705) a été formée par PCR à partir du gène natif.

On a représenté dans la Figure 1A les séquences à la fois du gène synthétique (Bac19) et du « gène natif » (PF19).

On remarque que 57 codons sur les 93 codons de la séquence codante native pour la p19 issue de *P.falciparum* ont été modifiés (pour ce qui est du troisième nucléotide dans 55 d'entre eux et du premier et troisième nucléotides dans les deux codons restant). Des codons nouveaux ont été ajoutés à l'extrémité 5' pour introduire le peptide signal dans les conditions qui ont été indiquées ci-dessus et pour introduire un site EcoRI pour le clonage, d'une part, et de même ont été ajoutés deux codons stop non présents dans la p19 de *P.falciparum* aux fins d'obtenir des signaux de terminaison de l'expression. Les lettres individualisées placées respectivement au dessus des codons successifs correspondent aux acides aminés respectifs successifs. Les astérisques (\*) se rapportent aux codons stop. Les lignes verticales soulignent les nucléotides qui sont les mêmes dans les deux séquences.

**15 Description de la construction PfMSP1<sub>p19</sub>A (ancré GPI) (p19 ancrée de *P.falciparum*)**

La construction PfMSP1<sub>p19</sub>A a des caractéristiques de la précédente sauf que la séquence synthétique (**Figure 1B**) code pour le MSP1<sub>p19</sub> de *Plasmodium falciparum* (isolat Uganda-Palo alto) de Asn<sub>1613</sub> à Ile<sub>1726</sub> suivie par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est ancrée dans la membrane plasmique des cellules infectées par une structure du type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI).

25 La **figure 1C** est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1<sub>p19</sub>S avant coupure de la séquence signal.

La **figure 1D** est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1<sub>p19</sub>S après coupure de la séquence signal.

Les acides aminés soulignés dans les figures 1C et 1D proviennent du site EcoR1 utilisé pour joindre les séquences nucléotidiques dérivées de la partie N-terminale de MSP1 de *P.vivax* (avec séquence signal) et de MSP1<sub>p19</sub> de *P.falciparum*.

5        **Figure 2** - L'antigène recombinant PfMSP1<sub>p19</sub> soluble purifié par immunoaffinité a été analysé par immunoblot après SDS-PAGE en présence (réduit) ou absence (non réduit) de B-mercaptoéthanol. Les échantillons sont chargés sur gel après chauffage à 95°C en présence de 2% SDS. Dans ces conditions seulement des liaisons du type covalent  
10 (ponts disulfure) peuvent résister à la désagrégation. Le blot de gauche a été révélé avec un anticorps monoclonal qui réagit avec un épitope linéaire de la p19 naturelle. Le blot de droite a été révélé avec un mélange de 13 antisera humains provenant des sujets avec une immunité acquise au paludisme dû à *Plasmodium falciparum*. Ces résultats montrent que la  
15 molécule recombinante de baculovirus reproduit bien les épitopes conformationnels en forme de polymère qui sont reconnus en majorité par l'antiserum humain.

**Figure 2B:** Analyse par immunoblot avec antiserum humain du  
20 MSP-1 p19 purifié de *P. vivax* et *P. cynomolgi* recombinant dans des conditions non-réduites (NR), réduite seulement dans le milieu de chargement (R) et réduite irréversiblement (IR):

Ce travail est basé sur l'idée que le système d'expression baculovirus reproduit correctement et en grande proportion les épitopes  
25 conformationnels présents *in vivo* sur la partie C-terminale de MSP-1. Le meilleur moyen de mesurer cette propriété (et peut être le seul moyen possible en absence des protéines natives purifiées correspondant au p19) est d'étudier la réactivité des protéines recombinantes avec l'antiserum des individus exposés au paludisme, ceci étant un reflet des  
30 protéines natives telles qu'elles sont "vues" par le système immunitaire humain.

Donc, les antigènes recombinants PvMSP-1 p19 et Pc MSP-1 p19 solubles purifiés par immunoaffinité ont été analysés par immunoblot après SDS-PAGE (15%) en présence (réduit) ou absence (non-réduit) de DTT. Les échantillons sont chargés sur gel après chauffage à 95°C en présence de 2% SDS. La réduction irréversible était faite comme suit: la protéine est resuspendue en 0.2 M Tris-HCl, pH 8.4, 100 mM DTT, 1.0% SDS et chauffée 30 minutes à 70°C. Après dilution avec l'eau, de l'acrylamide est ajouté à une concentration finale de 2 M et la mixture est incubée sous azote sans lumière 1 heure à 37°C. L'immunoblot a été révélé avec un mélange de 25 antisera humains provenant des sujets avec une immunité acquise au paludisme dû à *Plasmodium vivax*. V et C désignent respectivement les protéines dérivées de MSP-1 de *P. vivax* et *P. cynomolgi*. Il est remarquable que les protéines recombinantes réduites de façon irréversible ne montrent aucune réactivité avec l'antisérum humain tandis que les protéines réduites de façon non-irréversible ou non-réduites montrent une bonne réactivité. (Le Pv MSP-1 p19 non-réduit est un peu faible parce que dans son état glycosylé il ne se lie pas très bien au papier nitrocellulose.) Ces résultats montrent que la reconnaissance des molécules MSP-1 p19 de baculovirus par l'antisérum humain est en grande partie, sinon complètement dépendant des épitopes conformationnels sensibles à la réduction qui sont reproduits dans ce système.

**Figure 3** - L'antigène recombinant PvMSP1<sub>p42</sub> soluble (Longacre et al. 1994, op.cit.) a été incubé pendant 5 heures à 37° en présence des fractions de protéines dérivées des mérozoïtes de *P. falciparum* et séparées par isoélectrofocalisation. Par la suite les échantillons ont été analysés par immunoblot en présence (réduit) ou absence (non réduit) de B-mercaptoéthanol. Les fractions 5 à 12 d'isoélectrofocalisation, ainsi que deux extraits totaux de mérozoïtes faits en présence (Tex) ou absence (T) de détergent ont été analysés. L'immunoblot a été révélé avec des anticorps monoclonaux spécifiques pour le MSP1<sub>p42</sub> et p19 de *P. vivax*. Les

résultats suggèrent qu'il y a une activité protéolytique dans les mérozoïtes de *P. falciparum* qui peut être extraite en détergent. La digestion du p42 dans certaines fractions semble provoquer une polymérisation des produits de digestion (p19); cette polymérisation est probablement liée à la formation de ponts disulfure puisqu'en présence de B-mercaptoéthanol, les formes de haut poids moléculaire disparaissent en faveur d'une molécule d'environ 19 kDa (Tex-R). La polymérisation du p19 observée dans ces expériences pourrait donc être une propriété intrinsèque de cette molécule *in vivo*.

**Figure 3B:** La contribution différentielle des antigènes p42 et p19 à la réponse humaine anti-MSP-1 de *P. vivax*.

La reconnaissance des antigènes MSP-1 p42 et p19 de *P. vivax* par l'antisérum des individus ayant une immunité acquise à *P. vivax* a été comparée par la technique d'inhibition d'ELISA comme suit: un mélange de 25 antisérums humains provenant des sujets avec une immunité acquise au paludisme dû à *P. vivax* a été dilué au 1:5000 et incubé 4 heures à température ambiante soit seul, soit en présence d'une solution de 1 mM p42 ou p19 recombinant purifié de *P. vivax*. Cette mixture a été transférée dans un puits de microtitre auparavant revêtu pendant 18 heures à 4°C par 500 ng ml<sup>-1</sup> p42 ou p19 recombinant purifié absorbé, et incubée 30 minutes à température ambiante. Après lavage avec PBS contenant 0.1% Tween 20, un anti-souris IgG de chèvre conjugué avec peroxydase a été ajouté et la mixture a été incubée 1 heure à 37°C et l'activité enzymatique a été révélée par lecture de la densité optique à 492 nm. La pourcentage d'inhibition a été calculée basé sur des valeurs de 100% de réactivité d'antisérum avec l'antigène revêtu en plaque de microtitre en absence d'un antigène compétiteur. Les données statistiques ont été calculées en utilisant le programme Statview. Chaque barre représente l'inhibition moyenne en pourcentage d'une paire d'antigènes compétiteur / absorbé basée sur 4 à 12 déterminations et les lignes

verticales correspondent à un intervalle de 95% de confiance. Les étoiles (\*) désignent des antigènes produits en présence de tunicamycine, donc sans N-glycosylation. Les paramètres importants de ces mesures sont la dilution d'antisérum à 1:5000 qui est dans la région sensible des courbes d'ELISA et les concentrations d'antigènes compétiteurs à 1 mM qui incluent la compétition par les épitopes de basse affinité. Donc, les données reflètent la similitude maximum entre les deux antigènes comparés. Les résultats montrent que la plupart, si ce n'est pas tous les épitopes du p42 reconnus par l'antisérum humain sont présents sur le p19 puisqu'en présence de ce dernier, la réactivité de l'antisérum humain contre le p42 est inhibée autant que par l'antigène p42 lui même. Mais, au contraire, environ 20% des épitopes du p19 reconnus par l'antisérum humain ne le sont pas ou ne sont pas accessibles sur le p42, puisque la réactivité de l'antisérum humain contre le p19 est bien moins inhibée par le p42 que par le p19 lui même. Des tels épitopes spécifiques du p19 peuvent être constitué ou révélés seulement après la coupure du p42 en p19 et p33. Ces résultats ne sont pas affectés par la glycosylation montrant que l'effet est bien dû à une différence entre les composants peptidiques du p19 et p42 et pas à une différence de glycosylation. Ces résultats soulignent le fait que le p19 a une identité immunologique distincte du p42.

#### **Description de la construction PcMSP1<sub>p19</sub>S (soluble) (p19 soluble de *P.cynomolgi*)**

L'ADN utilisé pour la construction susdite a été obtenu à partir d'un clone de la souche de *Plasmodium cynomolgi ceylonesis* (22-23). Cette souche a été maintenue par des passages successifs dans son hôte naturel (*Macaca sinica*) et des transmissions cycliques par l'intermédiaire de moustiques (27).

Des parasites sanguins ont été obtenus à partir des singes infectés au stade schizonte mature quand les parasitémies ont atteint un niveau de



5%. Ils ont alors été purifiés selon la méthodes décrites dans (25). L'ADN a ensuite été extrait comme décrit dans (26).

Un fragment de 1200 paires de base a ensuite été produit en ayant recours à la réaction PCR mettant en oeuvre les oligonucléotides soulignés dans la **Figure 4** et issus de *P.vivax*. L'oligonucléotide 5' comprenait un site de restriction EcoRI et l'oligonucléotide 3' deux codons synthétiques stop TAA suivis d'un site de restriction BglII. Ce fragment a été introduit par ligation et par l'intermédiaire de ces sites EcoRI et BglII dans le plasmide pVLSV<sub>200</sub> contenant déjà la séquence signal de la protéine MSP-1 de *P.vivax* (19). Le nouveau plasmide (pVLSV<sub>200</sub>C<sub>42</sub>) a été utilisé pour l'analyse de séquences d'ADN.

Les séquences de *P.cynomolgi* et des séquences correspondantes de *P.vivax* ont été mises en alignement. Les flèches noires désignent les sites de clivage primaire et secondaire présumés. Ils ont été déterminés par analogie avec les sites connus dans *P.falciparum* (27, 28). Des lignes verticales et des flèches horizontales localisent les limites des quatre régions qui ont été étudiées. La région 4 correspond à la séquence codant pour la p19 de *P.cynomolgi*. Des sites de glycosylation sont encadrés et les cystéines conservées sont soulignées. Dans la partie inférieure de la **Figure 4** sont indiqués les pourcentages identité entre les deux isolats de *P.vivax* et *P.cynomolgi*.

La construction recombinante PcMSP1<sub>p19</sub>S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de bases de la séquence « leader » et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met<sub>1</sub> à Asp<sub>32</sub> (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par la séquence codant pour le MSP1<sub>p19</sub> de *Plasmodium cynomolgi* (souche Ceylon) de Lys<sub>276</sub> à Ser<sub>380</sub>. La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules infectées.

**Purification de la protéine recombinante PfMSP1p19 par chromatographie d'immunoaffinité avec un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement la p19 de *Plasmodium falciparum*.**

La résine de chromatographie a été préparée en liant 70 mg d'un  
5 anticorps monoclonal (obtenu à partir d'un hybridome G17.12 déposé à la  
CNCM (Paris, France) le 14 février 1997 sous le n°I-1846 ; cet hybridome  
G17.12 a été construit à partir du myélome X63 Ag8 653 produisant des  
IgG 2a/k reconnaissant la p19 de *P.falciparum*) à 3g de CNBr-Sepharose  
4B activé (Pharmacia) par des méthodes standards détaillées dans le  
10 mode d'emploi fourni par Pharmacia. Les surnageants de culture contenant  
le PfMSP1p19 soluble ont été incubés en batch avec la résine de  
chromatographie pendant 16 heures à 4°C. La colonne a été lavée une  
fois avec 20 volumes de 0.05% NP40, 0.5M NaCl, PBS ; une fois avec 5  
volumes de PBS et une fois avec 2 volumes de 10 mM phosphate de  
15 sodium, pH 6.8. L'élution a été effectuée avec 30 ml de 0.2 M glycine, pH  
2.2. L'éluat a été neutralisé avec 1 M phosphate de sodium, pH 7.7 puis  
concentré par ultrafiltration et dialysé contre du PBS. Pour la purification  
du PfMSP1p19 ancré, toutes les solutions de lavage et élution contenaient  
en supplément 0.1% 3-(Diméthyl-dodecylammonio)-propane sulfonate  
20 (Fluka).

**Essai de vaccination de MSP1 recombinant de *Plasmodium vivax* (p42 et p19) chez le singe écureuil *Saimiri sciureus*.**

Cet essai de vaccination a été fait chez des *Saimiri sciureus*  
25 *boliviensis* mâles de 2 à 3 ans, non splénectomisés. Trois singes ont été  
injectés 3 fois par voie intramusculaire à 3 semaines d'intervalle avec un  
mélange d'environ 50 à 100 µg chacun, de PvMSP1<sub>p42</sub> et p<sub>19</sub> soluble  
recombinant (19), purifié par immunoaffinité. L'adjuvant de Freund complet  
et incomplet était utilisé comme suit : 1<sup>ère</sup> injection : 1:1 FCA/FIA ; 2<sup>ème</sup>  
30 injection 1:4 FCA/FIA ; 3<sup>ème</sup> injection : FIA. Ces compositions d'adjuvant

étaient mélangées par la suite 1:1 avec l'antigène en PBS. Les cinq singes contrôles recevaient l'antigène glutathione-S-transferase (GST) produit dans *E.coli* selon le même protocole. L'infection d'épreuve était effectuée en injectant  $2.10^6$  hématies infectées avec une souche adaptée de *Plasmodium vivax* (Belem) 2.5 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux par examen des frottis colorés avec giemsa.

Les courbes de la **Figure 5** sont représentatives de la variation de la parasitémie mesurée en nombre d'hématies parasitées par microlitre de sang (sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) en fonction du temps écoulé après l'infection (en jours). La courbe A correspond aux valeurs moyennes observées chez les trois singes vaccinés, la courbe B ; les valeurs moyennes chez cinq singes témoins.

De l'examen de la figure découle une très forte réduction de la parasitémie sous l'effet de la vaccination.

#### **Essai de vaccination de MSP1 recombinant de *Plasmodium cynomolgi* (p42 et p19) chez le singe toque, *Macaca sinica*.**

Quinze singes capturés ont été utilisés comme suit : (1) 3 animaux injectés avec 100 µg PcMSP1<sub>p42</sub> soluble ; 3 animaux injectés avec 35 µg (1<sup>ère</sup> injection) ou 50 µg (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> injections) PcMSP1<sub>p19</sub> soluble ; (3) 3 animaux injectés avec un mélange de PcMSP1<sub>p42</sub> et p19 ; (4) 3 animaux injectés avec l'adjuvant plus PBS ; (5) 3 animaux non injectés. L'adjuvant de Freund complet et incomplet a été utilisé selon le protocole décrit ci-dessus. Les injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant  $2.10^5$  hématies infectées avec *Plasmodium cynomolgi* 4 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux en examinant les parasitémies avec giemsa. Les parasitémies ont été classées comme négatives uniquement

après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémiés sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées.

Les **Figures 6A-6G** sont illustratives des résultats obtenus. Dans chacune d'elles apparaissent les parasitémiés (exprimées en pourcentages d'hématies parasitées sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) observées chez les animaux d'épreuve en fonction des temps après l'infection (en jours sur les axes des abscisses).

Les résultats concernent :

- dans la **figure 6A** ; des animaux contrôles non vaccinés ;
- 10 ◦ la **figure 6B** concerne des animaux qui avaient reçu une solution saline contenant en outre l'adjuvant de Freund ;
- la **figure 6C** est une superposition des figures 6A et 6B, dans le but de faire apparaître les résultats relatifs résultant de l'administration de l'adjuvant de Freund aux animaux (les variations ne sont évidemment pas significatives) ;
- 15 ◦ la **figure 6D** fournit les résultats obtenus à l'issue d'une vaccination avec la p42 ;
- la **figure 6E** concerne des animaux vaccinés avec la seule p19 ;
- enfin, la **figure 6F** concerne les animaux vaccinés avec un mélange de
- 20 p19 et p42.

La p42 induit certes un certain niveau de protection. Mais comme en témoignent les figures 6E et 6F, la protection conférée par la p19 recombinante selon l'invention est considérablement améliorée.

On peut formuler l'hypothèse que l'amélioration de la protection résulte d'un clivage secondaire de la p42 qui s'accompagne du dévoilement de cystéine libre qui forme, par la suite, des ponts disulfure intermoléculaires donnant lieu à des multimères du p19 très caractéristiques de cette forme dans les protéines recombinantes des trois espèces testées.

Les chiffres utilisés pour élaborer les graphiques (6A-6F) sont précisés dans la **Figure 6G**.

5      **Essai de vaccination *P.cynomolgi*/singes toque ; deuxième infection d'épreuve sur singes vaccinés avec p19 seule et contrôles (Figures 8)**

Six mois plus tard, sans autre immunisation, les 3 singes ayant reçu le MSP-1 p19 seule avec FCA/FIA (Figure 6E) et les 3 singes ayant reçu une solution saline contenant l'adjuvant de Freund (Figure 6B) ainsi que 2 nouveaux singes naïfs non vaccinés ont subi une nouvelle infection  
10 d'épreuve par injection de  $1.10^6$  hématies infectées avec *Plasmodium cynomolgi*. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémi-  
journalières chez tous les animaux en examinant les frottis avec du giemsa. Les parasitémi-  
es ont été classées comme négatives uniquement après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémi-  
es sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées (les chiffres utilisés pour  
15 élaborer les graphiques 8A-C sont précisés dans la **Figure 8D**). Les six animaux immunisés qui avaient subi une infection d'épreuve six mois auparavant n'avaient pas de parasitémie détectable sauf pour 1 animal dans chaque groupe qui a présenté une parasitémie à 0.008% pendant 1  
20 jour (**Figures 8A et 8B**). Les deux contrôles naïfs montrent une parasitémie classique avec un maximum de 0.8% et pendant 21 jours (**Figure 8C**). Donc, les 3 animaux vaccinés avec le MSP-1 p19 étaient aussi protégés six mois plus tard que les 3 contrôles qui présentaient une infection complète classique après la première infection d'épreuve, malgré  
25 une absence ou un très faible parasitémie après la première infection d'épreuve. Ces résultats suggèrent que la durée de protection du p19 est au moins de six mois.

**Essai de vaccination avec p19 en association avec alun dans le système *P.cynomolgi* singe toque (Figures 9)**

Les résultats positifs de protection précédents ont été obtenus en utilisant l'adjuvant complet (FCA) ou incomplet (FIA) de Freund.

5 Cependant, le seul adjuvant admis actuellement chez l'homme est l'alun. Pour cette raison, nous avons fait un essai de vaccination avec le MSP-1 p19 de *P. cynomolgi* chez le singe toque en présence d'alun comme adjuvant. Six singes capturés ont été utilisés comme suit: (1) 3 animaux injectés avec 4 doses de 50 mg MSP-1 p19 recombinant de *P. cynomolgi*

10 avec 20 mg d'alun (2) 3 animaux injectés 4 fois avec de l'eau physiologique et 10 mg de alun. Les injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant  $2.10^5$  hématies infectées avec *P. cynomolgi* 4 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les

15 parasitémiés journalières chez tous les animaux en examinant les frottis avec le giemsa. Les parasitémiés ont été classées comme négatives uniquement après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémiés sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées. Les résultats de cette expérience sont les suivants: 2 des 3 singes immunisés avec le p19

20 recombinant en alun avaient environ 30 fois moins de parasitémie totale pendant la durée de l'infection (**Figures 9A et 9B**) que les 3 singes contrôles immunisés avec de l'eau physiologique et de l'alun (**Figure 9D**) après l'infection d'épreuve. Le troisième singe immunisé avec p19 (**Figure 9C**) n'était pas très différent des contrôles. Pour l'essai de vaccination de

25 *Plasmodium cynomolgi* p19 chez le singe toque, *Macaca sinica*, décrit dans la Figure 9, les chiffres utilisés pour élaborer les graphiques (9A-9D) sont précisés (**Figure 9E**). Bien que ces résultats soient un peu moins spectaculaires que les précédents (Figures 6, 8); c'est la première fois qu'une protection significative est observée pour MSP-1 recombinante en

30 alun.

**Figure 10** : Essai de vaccination avec une p19 recombinante de *Plasmodium falciparum* chez le singe écureuil.

Vingt singes *Saimiri sciureus guyanensis* (singe écureuil) d'environ 3 ans élevés en captivité ont été utilisés comme suit: (1) 4 animaux injectés avec 50 mg de Pf MSP-1 p19 soluble en présence d'adjuvant de Freund comme suit: 1<sup>ère</sup> injection: 1:1 FCA/FIA; 2<sup>ème</sup> injection: 1:4 FCA/FIA; 3<sup>ème</sup> injection: FIA. Ces compositions d'adjuvant ont ensuite été mélangées avec l'antigène en PBS 1:1; (2) 2 animaux contrôles recevaient l'adjuvant de Freund comme décrit pour (1) avec uniquement PBS; (3) 4 animaux injectés avec 50 mg de Pf MSP-1 p19 soluble en présence de 10 mg d'alun (Alu-Gel-S, Serva); (4) 2 animaux contrôles recevaient 10 mg d'alun avec uniquement PBS; (5) 4 animaux injectés avec environ 50-100 mg Pf MSP-1 p19 ancré GPI reconstitués en liposomes comme suit: 300 mmoles de cholestérol et 300 mmoles de phosphatidyl choline étaient séchés sous vide et resuspendus en 330 mM N-octylglucoside en PBS avec 1.4 mg de Pf MSP-1 p19,GPI. Cette solution avait été dialysée contre PBS avec des Bio-Beads SM-2 adsorbant (Bio-Rad) et les liposomes ainsi formés étaient concentrés par centrifugation et resuspendus en PBS. La 1<sup>ère</sup> injection était faite avec des liposomes frais maintenus à 4°C et les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> injections étaient faites avec des liposomes ayant été congelés pour conservation; (6) 2 animaux injectés avec des liposomes contrôles faits de la même façon en absence de l'antigène p19, GPI, comme décrit pour (5); (7) 2 animaux injectés avec de l'eau physiologique. Trois injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant  $1.10^6$  hématies infectées avec *Plasmodium falciparum*. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux en examinant les frottis avec giemsa. Les parasitémies sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées. Les

résultats de cet essai de vaccination sont exposés dans les **Figures 10, A-G**.

Les groupes immunisés avec le p19 en adjuvant de Freund ou en liposome ont démontré des parasitémiées semblables aux groupes  
5 contrôles après une infection d'épreuve (un animal (numéro 29) vacciné avec p19 en adjuvant de Freund est mort quelques jours après l'infection d'épreuve pour des raisons indépendantes de la vaccination (crise cardiaque)). Des irrégularités dans l'administration de l'antigène dans ces  
10 2 groupes (mauvaise émulsion de Freund, liposomes congelés) ne permettent pas d'évaluer de façon complète la signification de ces résultats. Dans le groupe alun 2 animaux ont montré des parasitémiées  
totales pendant la durée de l'infection environ 4 fois moins importantes que les contrôles, 1 animal environ 3 fois moins importante et 1 animal était  
semblable aux contrôles. Cette expérience est un peu difficile à interpréter  
15 à cause de la variabilité dans les contrôles, probablement due à la souche de parasite utilisée pour l'infection d'épreuve qui n'aurait pas été assez adaptée au modèle *Saimiri* non spénectomisé mis au point que récemment à Cayenne. Néanmoins, l'effet réel, quoiqu'imparfait, avec l'alun est  
encourageant dans la mesure où nos antigènes semblent être les seules  
20 versions recombinantes MSP-1 de *P. falciparum* qui, pour l'instant, ont démontré une certaine efficacité en association avec l'alun.

**Essai de vaccination avec une p19 recombinante de *Plasmodium falciparum* chez le singe écureuil (même essai que Figures 10)**

25 Des singes élevés en captivité ont été injectés avec 1 ml d'inoculum par voie intramusculaire 2 fois à 4 semaines d'intervalle comme suit : (1) 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en présence  
d'adjuvant de Freund comme suit: 1<sup>ère</sup> injection 1:1 FCA/FIA; 2<sup>ème</sup> injection 1:4 FCA/FIA; et mélangés par la suite 1:1 avec l'antigène en  
30 PBS; (2) 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en



présence de 10 mg d'alun; (3) 4 animaux injectés avec environ 50 µg de PfMSP1p19 ancré GPI reconstitués en liposomes composés 1:1 en molarité de cholestérol et phosphatidyl choline. Les animaux ont été saignés 17 jours après la deuxième injection.

5 Les globules rouges provenant d'un singe écureuil avec 30% de parasitémie due à *P. falciparum* (avec des formes mûres en majorité) ont été lavés en PBS et le culot était dilué 8 fois en présence de 2% SDS et 2% dithiothreitol et chauffé à 95° avant d'être chargé sur un gel de polyacrylamide de 7.5% (gel de séparation) et 4% (gel de stacking) (haut  
10 du gel). Après transfère en nitrocellulose l'analyse par immunoblot (immunoempreinte) a été fait avec des antisera comme suit: (1) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant de Freund dilué au vingtième ; (2) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant alun dilué au vingtième ; (3) pool  
15 d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 ancré en liposomes dilué au vingtième ; (4) l'anticorps monoclonal, qui réagit avec un épitope linéaire de PfMSP1p19, à 50 µg/ml ; (5) pool d'antisera SHI90 provenant d'un vingtaine de singes infectés à répétition par *P. falciparum* et devenus réfractaires à toute infection ultérieure de *P. falciparum*, dilué au cinq  
20 centième ; (6) pool d'antisera des singes naïfs (n'ayant jamais été exposés à *P. falciparum*) dilué au vingtième.

Les résultats montrent que les 3 pools d'antisera des singes vaccinés avec le PfMSP1p19 réagissent de façon importante et spécifique avec des complexes de très haut poids moléculaire (se trouvant de façon  
25 diffuse dans le gel de stacking) et présents dans des extraits de parasite contenant davantage de formes mûres. Ces résultats confortent l'hypothèse de la présence d'une agrégation spécifique du MSP1p19 *in vivo* comportant des épitopes qui sont reproduits dans les molécules recombinantes PfMSP1p19 synthétisées dans le système baculovirus, en  
30 particulier celles en forme d'oligomère.

La figure 7 illustre également ces résultats. Elle se rapporte aux immunoempreintes produites sur gel. Les trois premières colonnes du gel illustrent la réponse in vivo de singes à des injections de p19 [(1) avec l'adjuvant de Freund, (2) avec de l'alun, (3) sous forme de liposome] et  
5 notamment l'existence de complexes de haut poids moléculaire confortant l'hypothèse de l'agrégation in vivo de p19 sous forme d'oligomère, spécifique du stade de maturation (quand p42 est coupé en p19 et p33).

Cet essai de vaccination comprend également une troisième injection identique aux précédentes. L'injection avec l'adjuvant de Freund  
10 comprend uniquement du FIA.

Il y a deux animaux contrôles pour chaque groupe, à savoir : 2 animaux contrôles injectés avec PBS et l'adjuvant de Freund ; 2 animaux contrôles injectés avec PBS et alun ; 2 animaux contrôles injectés avec liposomes sans protéine ; et deux animaux injectés avec PBS sans  
15 adjuvant. La protection est évaluée comme décrit ci-dessus.

**Figure 7B:** Les données pour cette figure sont dérivées de l'essai de vaccination de *P. falciparum* / singe écureuil (Figure 10 ci-après). Les chiffres correspondent aux singes individuels notés dans la Figure 10. Les  
20 techniques et méthodes pour cette figure sont les mêmes que pour la Figure 7 sauf que l'antisérum individuel de chaque singe noté a été testé après trois injections le jour de l'infection d'épreuve et l'antisérum SHI a été dilué 1:250. Les résultats montrent que l'antisérum des 4 singes vaccinés avec le p19 et alun réagissent de façon importante et spécifique  
25 avec des complexes de très haut poids moléculaire tandis que les singes des autres groupes vaccinés avec le p19 et l'adjuvant de Freund ou des liposomes ne montrent qu'une faible réactivité avec ces complexes. Puisque les singes vaccinés avec p19 et alun ont aussi été le mieux protégés, cette réactivité avec les complexes de haut poids moléculaire  
30 paraît indiquer un effet protecteur, et cela malgré qu'un singe dans le

groupe alun n'était pas protégé par rapport aux contrôles et qu'un autre ne l'était que partiellement.

5 L'invention concerne naturellement d'autres applications, par exemple celles exposées ci-après en rapport avec certains des exemples, lesquels ne présentent aucun caractère limitatif.

#### Thérapeutique

10 La molécule recombinante PfMSP1p19 peut être utilisée pour produire des anticorps spécifiques éventuellement utilisables par transfert passif dans un but de thérapeutique adaptée au paludisme sévère dû à *P. falciparum* avec risque de mortalité.

#### Diagnostic

15 Les molécules recombinantes PvMSP1p42 et PvMSP1p19 et PfMSP1p19 dérivées de baculovirus peuvent et ont été utilisées pour produire des anticorps monoclonaux spécifiques murins. Ces anticorps, en combinaison avec des antisera polyclonaux anti MSP1p19 provenant d'une autre espèce telle que le lapin ou la chèvre, peuvent être à la base d'un test de diagnostic semi-quantitatif pour le paludisme et capable de  
20 distinguer entre un paludisme dû à *P. falciparum*, qui peut être mortel, et un paludisme dû à *P. vivax*, qui n'est généralement pas mortel. Le principe de ce test serait de piéger et quantifier toute molécule de MSP1 contenant la partie p19 dans le sang.

25 Dans ce cadre, les avantages de la molécule MSP1p19 sont les suivants:

(i) elle est à la fois extrêmement bien conservée au sein d'une même espèce et suffisamment divergente entre des espèces différentes pour permettre de produire facilement des réactifs spécifiques d'espèce. Aucune réaction croisée n'a été observée entre les anticorps dérivés de  
30 PfMSP1p19 et PvMSP1p19 ;

(ii) la fonction du MSP1p19, bien que non connue avec précision, semble être suffisamment importante pour que cette molécule ne varie pas de façon significative ou soit délétée sans effet létal pour le parasite ;

(iii) c'est un antigène majeur se trouvant sur tous les mérozoïtes et donc, il doit être, en principe, détectable même à basse parasitémie et proportionnellement à la parasitémie ;

(iv) puisque les molécules recombinantes de MSP1p19 dérivées de baculovirus semblent reproduire davantage la structure native de MSP1p19, les anticorps produits contre ces protéines seraient bien adaptés à un usage diagnostique.

Les microorganismes identifiés ci-dessous ont été déposés suivant la règle 6.1. du Traité de Budapest à la date du 01 février 1996, sous les numéros suivants :

15	<u>Références d'identification</u>	<u>Numéros d'enregistrement</u>
	PvMSP1p19A	I - 1659
	PvMSP1p19S	I - 1660
	PfMSP1p19A	I - 1661
	PfMSP1p19S	I - 1662
20	PcMSP1p19S	I - 1663

L'invention concerne également l'utilisation de ces anticorps, alors de préférence préalablement fixés sur un support solide (par exemple pour chromatographie d'affinité), pour la purification de peptides du type p19 initialement contenus dans un mélange.

La purification fait alors intervenir une mise en contact de ce mélange avec l'anticorps, la dissociation du complexe antigène-anticorps et la récupération du peptide de type p19 purifié.

L'invention concerne également des compositions de vaccin, comprenant également des mélanges de protéines ou de fragments, notamment des mélanges du type :

- p19 de *P.falciparum* et p19 de *P.vivax*,
- p19 de *P.falciparum* et p42 de *P.falciparum*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables,
- p19 de *P.vivax* et p42 de *P.vivax*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables,
- p19 de *P.falciparum* et p42 de *P.falciparum*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables, et p19 de *P.vivax* et p42 de *P.vivax*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables.

On entend dans le cas présent définir les régions les plus hypervariables comme la région II ou la région II et la région III en partie ou dans sa totalité, la partie de la région III préférablement déléetée étant celle qui est juxtaposée à la région II (la partie conservée se situant du côté C-terminal de la p33, proche de la p19). Les régions II et III sont illustrées en figure 4.

L'invention n'est pas limitée à la production de vaccin humain. Elle s'applique tout autant à la production de compositions de vaccin vétérinaire mettant en oeuvre les protéines ou antigènes correspondants dérivés de parasites infectieux pour des mammifères et produits dans les mêmes conditions. Il est en effet connu que des infections du même type, la babésiose, apparaissent aussi chez les bovins, les canins et les équins. un des antigènes des espèces *Babesia* présente une forte homologie conformationnelle (notamment les deux domaines « EFG-like » et richesse en cystéine) et fonctionnelle avec une partie protéique de MSP-1 [(36), (37) et (38)].

Des exemples de vaccins vétérinaires utilisant un antigène soluble contre de tels parasites on été décrits (39).

Il va sans dire que les p19 mises en oeuvre dans ces mélanges peuvent également donner lieu à toutes les modifications dont il a été

question dans ce qui précède, lorsqu'elle était prise en considération de façon isolée.

## RÉFÉRENCES

- (1) Holder, J.A. et al. (1982) « Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody ». J. Exp. Med. **156** : 1528-1538.
- 5 (2) Howard, R. et al. (1984) « Localization of the major *Plasmodium falciparum* glycoprotein on the surface of mature intracellular trophozoites and schizonts ». Mol. Biochem. Parasitol. **11** : 349-362.
- (3) Pirson, P. et al. (1985) « Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites ». J. Immunol. **134** :  
10 1946-1951.
- (4) Aley, S.B. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: Exoerythrocytic schizonts recognized by monoclonal antibodies against blood-stage schizonts ». Exp. Parasitol. **64** : 188-194.
- (5) Holder, A.A. (1988) « The precursor to major merozoite surface antigen: structure and role in immunity ». Prog. Allergy **41** : 72-97.
- 15 (6) Cooper, J.A. (1993) « Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium* ». Parasitol. Today **9** : 50-54.
- (7) Holder, A.A., et al. (1987) « Processing of the precursor to the major merozoite antigens of *Plasmodium falciparum* » Parasitology **94** : 199-208.
- 20 (8) Lyon, J.A. et al. (1986) « Epitope map and processing scheme for the 195 000-dalton surface glycoprotein of *Plasmodium falciparum* merozoites deduced from cloned overlapping segments of the gene ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 2989-2993.
- (9) Blackman, M.J. et al. (1992) « Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP1<sub>33</sub> as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSOP1 ». Mol. Biochem. Parasitol. **50** : 307-316.
- 25 (10) Haldar, K., et al. (1985) « Acylation of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen via sn-1,2-diacyl glycerol. ». J. Biol. Chem. **260** : 4969-4974.
- 30 (11) Braun Breton, C. et al. (1990) « Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens ». Res. Immunol. **141** : 743-755.

- (12) Kumar, S. et al. (1995) « Immunogenicity and *in vivo* Efficacy of Recombinant *Plasmodium falciparum* Merozoïte surface protein-1 in *Aotus* Monkeys ». Molecular Medicine, Vol. 1, 3 : 325-332.
- 5 (14) Longacre, S. et al. (1994) « *Plasmodium vivax* merozoïte surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus ». Mol. Biochem. Parasitol. 64 : 191-205.
- 10 (15) McBride, J.S. et al. (1987) « Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoïtes form an antigenic complex ». Mol. Biochem. Parasitol. 23 : 71-84.
- (16) Blackman, M.J. et al. (1990) « A single fragment of a malaria merozoïte surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies ». J. Exp. Med. 172 : 379-382.
- 15 (17) Kaslow, D.C. et al. (1994) « Expression and antigenicity of *Plasmodium falciparum* major merozoïte surface protein (MSP1<sub>19</sub>) variants secreted from *Saccharomyces cerevisiae* ». Mol. biochem. Parasitol. 63 : 283-289.
- (18) Chang, S.P., et al. (1992) « A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth ». J. Immunol. 149 : 548-555.
- 20 (19) Longacre, S. (1995) « The *Plasmodium cynomolgi* merozoïte surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other *Plasmodium* species ». Mol. Biochem. Parasitol. 74 : 105-111.
- 25 (20) Del Portillo, H.A., et al. (1990) « Primary structure of the merozoïte surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 4030-4034.
- (21) Gibson, H.L., et al. (1992) « Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax* ». Mol. biochem. Parasitol. 50 : 325-334.
- 30 (22) Dissanaïke, A.S., et al. (1965) « Two new malaria parasites, *Plasmodium cynomolgi ceylonensis* sub sp. nov. and *Plasmodium fragile* sp. nov. from monkeys in Ceylon ». Ceylon Journal of Medical Science 14 : 1-9.



- (23) Cochrane, A.H., et al. (1986) « Further studies on the antigenic diversity of the circumsporozoite proteins of the *Plasmodium cynomolgi* complex. ». Am. J. Trop. Med. Hyg. 35 : 479-487.
- (24) Naotunne, T. de S., et al. (1990) « *Plasmodium cynomolgi*: serum-mediated blocking and enhancement of infectivity to mosquitos during infections in the natural host, *Macaca sinica* ». Exp. Parasitol. 71, 305-313.
- (25) Ihalamulla, R.L. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation ». Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81 : 25-28.
- (26) Kimura, E., et al. (1990) « Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived in strains derived from malaria patients ». Gene 91 : 57-62.
- (27) Heidrich, H.-G., et al. (1989) « The N-terminal amino acid sequences of the *Plasmodium falciparum* (FCBI) merozoite surface antigen of 42 and 36 kilodalton, both derived from the 185-195 kilodalton precursor ». Mol. Biochem. Parasitol. 34 : 147-154.
- (28) Blackman, M.J., et al. (1991) « Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains ». Mol. Biochem. Parasitol. 49 : 29-34.
- (29) Adams, J.M. et al. (1992) « A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites ». Proc. Natl. Acad. Sci, 89:7085-7089.
- (30) Sim B.K.L. (1995) « EBA-175: An erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum* ». Parasitology Today, vol.II, n°6:213-217.
- (31) Sim B.K.L. (1994) « Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum* ». Science, 264:1941-1944.
- (32) Davies, A. et al. (1993), Biochem J. 295 (Pt3) : 889-896. « Expression of the glycosylphosphatidylinositol-linked complement-inhibiting protein CD59 antigen in insect cells using a baculovirus vector ».

- (33) Haziot A. et al. (1994) J. Immunol. 152 : 5868. « Recombinant soluble CD14 Inhibits LPS-Induced Tumor Necrosis Factor & Production by Cells in Whole Blood ».
- (34) Chang, S.P. et al., (1988) « *Plasmodium falciparum* : gene structure and  
5       hydropathy profile of the major merozoite surface antigen (gp195) of the  
Uganda-Palo Alto isolate. Exp. Parasitol. 67 : 1-11.
- (35) Holder, A.S. et al. (1985) « Primary structure of the precursor to the three  
major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites, Nature 317 :  
270-273.
- 10   (36) G. Bourdoiseau et al. (mai 1995) « Les babésioses bovines », Le point  
vétérinaire, vol.27, n°168.
- (37) P. Bourdeau et al. (mai 1995) « La babésiose canine à *Babesia canis* », Le  
point vétérinaire, vol.27, n°168.
- (38) C. Soulé (mai 1995) « Les babésioses équine », Le point vétérinaire,  
15       vol.27, n°168.
- (39) T.P.M. Schetters et al. (1995) « Vaccines against Babesiosis using Soluble  
Parasite Antigens », Parasitology Today, vol.11, n°12.
- (40) P.A. Burghaus et al. (1996) « Immunization of *Aotus nancymai* with  
20       Recombinant C Terminus of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface  
Protein 1 in Liposomes and Alun Adjuvant Does Not Induce Protection  
against a Challenge Infection », Infection and Immunity, 64:3614-3619.
- (41) S.P. Chang, et al. (1996) « A Recombinant Baculovirus 42-Kilodalton C-  
Terminal Fragment of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1  
Protects *Aotus* Monkeys against Malaria », Infection and Immunity, 64: 253-  
25       261.
- (42) L.H. Miller et al. (1997) « The Need for Assays Predictive of Protection in  
Development of Malaria Bloodstage Vaccines », Parasitology Today,  
vol.13, n°2:46-47.

30       L'invention concerne également les hybridomes sécréteurs  
d'anticorps spécifiques reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine  
MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux

pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaissant pas *Plasmodium vivax*.

En particulier, ces hybridomes sécrètent des anticorps monoclonaux qui reconnaissent pas la p19 de *Plasmodium vivax* et qui reconnaissent  
5 spécifiquement la p19 de *Plasmodium falciparum*.

L'invention concerne également un hybridome caractérisé en ce qu'il produit un anticorps spécifique qui reconnaît spécifiquement la p19 de *P.vivax* et la p19 de *P.cynomolgi*. Un hybridome F10-3 a été construit à partir du myélome X63 Ag8 653 produisant des IgG 2b/k reconnaissant la  
10 glycoprotéine p42 de *Plasmodium vivax*.

## REVENDICATIONS

- 5           1.     Protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :
- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, autre que *Plasmodium vivax*, et infectieux pour des
  - 10     mammifères, notamment l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
  - soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire
  - 15     une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
  - soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et
  - 20     cette protéine recombinante comportant le cas échéant des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.
- 25           2.     Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est reconnue par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant ou contre un *Plasmodium* homologue lorsqu'elle est à l'état non réduit ou dans un état réduit non irréversible, mais non reconnue ou peu reconnue par ces mêmes antisérums, lorsqu'elle est irréversiblement réduite.

3. Protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle inhibe la réactivité d'un antisérum humain immunitaire avec la p42 correspondante produite dans les mêmes conditions, aussi bien que cette p42 elle-même et que la p42 peut seulement  
5 partiellement inhiber la réactivité dudit antisérum humain contre la p19.

4. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique C-terminale de la p33 (fragment N-terminal de  
10 33 kDa) normalement du côté associé à la p19 dans la p42 correspondante, avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière séquence polypeptidique C-terminale de la p33 comportant, lorsqu'elle est présente, moins de 50 résidus d'acides aminés.

5. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique du côté C-terminal de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement associée à la p19 dans la p42 correspondante avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière  
20 séquence polypeptidique C-terminale de la p33, comportant, lorsqu'elle est présente, moins de 35, voire même moins de 10 résidus d'acides aminés.

6. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique du côté C-terminal de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement associée à la p19 dans la p42 correspondante avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière  
25 séquence polypeptidique C-terminale de la p33 étant limitée, lorsqu'elle est présente, à celle qui conserve un degré de conservation substantiel dans les *Plasmodium* infectieux pour l'homme, tels que *P.falciparum* ou  
30 *P.vivax*.

7. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la partie de fragment p19 contient au moins l'une des deux régions EGF normalement contenues dans cette p19.

5 8. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le poids moléculaire de ce fragment p19 ou de cette partie de fragment p19 est comprise entre 10 et 25 kDa, notamment entre 10 et 15 kDa.

9. Protéine recombinante selon l'une quelconque des  
10 revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle comporte également un groupe glycosylphosphatidylinositol (GPI) du type de ceux qui permettent un ancrage du fragment p19 à l'hôte cellulaire, notamment une cellule eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus, dans lequel ladite protéine recombinante est exprimée.

15 10. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est dépourvue de la partie C-terminale extrême hydrophobe qui intervient dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule  
20 eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

11. Protéine recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle est hydrosoluble.

12. Protéine recombinante selon l'une quelconque des  
25 revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence de la p19 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium falciparum* ou ladite partie du fragment correspondant.

13. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence de

la p19 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium cynomolgi* ou ladite partie du fragment correspondant.

14. Oligomère de la protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

5 15. Oligomère selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il contient de 2 à 50 unités monomère de ladite séquence polypeptidique de la protéine recombinante telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 13.

10 16. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce qu'elle est conjuguée à une molécule porteuse utilisable pour la production de vaccins.

15 17. Composition vaccinale contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif une protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- 25 • soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité

des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

18. Composition vaccinnante selon la revendication 17, caractérisée en ce que son principe actif consiste en une protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 2 à 13 ou 16, ou en un oligomère selon la revendication 14 ou 15.

19. Composition vaccinnante contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif un oligomère d'une protéine recombinante selon la revendication 17 ou la revendication 18.

20. Anticorps reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

21. Anticorps selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est monoclonal.

22. Anticorps selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est monoclonal et en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. falciparum*.

23. Anticorps monoclonal selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. vivax*.

24. Procédé de diagnostic différentiel permettant de distinguer entre une infection parasitaire due à *P. vivax*, d'une part, et une infection parasitaire due à un autre *Plasmodium*, d'autre part, caractérisé par les mises en contact d'un prélèvement biologique infecté par un *Plasmodium* avec un anticorps selon la revendication 23, d'une part, et avec un anticorps selon la revendication 21 ou 22, d'autre part, et la détection selon le cas, de la production ou non d'une réaction immunologique.

25. Vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible



d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence nucléotidique codant pour un peptide signal compatible avec l'expression dans un système baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée.

26. Vecteur modifié selon la revendication 25, caractérisé en ce que la susdite deuxième séquence polypeptidique est conforme à celle définie dans l'une quelconque des revendications 2 à 13.

27. Vecteur modifié selon la revendication 25, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est une séquence synthétique.

28. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique code pour un peptide signal issu de *Plasmodium vivax* et normalement associé à la protéine MSP-1 de ce *Plasmodium*.

29. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 25 à 28, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence d'extrémité C-terminale hydrophobe qui est impliquée dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

30. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 25 à 29, caractérisé en ce qu'il consiste en un baculovirus modifié.

31. Organisme, notamment cellule d'insecte du type Sf9, transfectable et transfecté par le vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 25 à 29.

32. ADN synthétique contenant une première séquence nucléotidique dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte *Plasmodium falciparum*, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de cet ADN dans un système baculovirus est apte à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% du total des nucléotides dont est constitué le susdit ADN synthétique.

33. ADN synthétique selon la revendication 32, caractérisé en ce que sa première séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence codant pour la région d'extrémité C-terminale hydrophobe normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine p19 à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

34. ADN synthétique selon la revendication 32 ou la revendication 33, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique est précédée d'une séquence nucléotidique signal codant pour un peptide signal normalement associé à une protéine MSP-1 de *Plasmodium*, homologue ou hétérologue vis-à-vis de la séquence principale.

35. ADN synthétique selon la revendication 34, caractérisé en ce que la séquence signal est issue de *P.vivax*.

36. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 32 à 35, caractérisé en ce que la susdite première séquence nucléotidique inclut une séquence 3'-terminale codant pour une région polypeptidique d'ancrage à la membrane cellulaire, ladite région d'ancrage se fixant sur la protéine recombinante exprimée à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé avec un vecteur contenant ledit ADN synthétique, ladite séquence 3' étant homologue à celle de la séquence nucléotidique principale, ou hétérologue, notamment celle issue de *P.vivax*.

37. ADN synthétique selon la revendication 36, caractérisé en ce que la séquence 3'-terminale est issue de *P.vivax*.

38. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 32 à 36, caractérisé en qu'il est dépourvu de ladite séquence 3'-terminale.

39. Vecteur de type baculovirus selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1659
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1660
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1661
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1662
- 5 ◦ le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1663.

40. Hybridome sécréteur d'anticorps monoclonaux ayant les spécificités des anticorps selon l'une quelconque des revendications 21 à 23.

41. Procédé de séparation d'un peptide p19 de spécificité  
10 donnée à partir d'un mélange de peptides, caractérisé par la mise en contact de ce mélange de peptides avec un anticorps correspondant, conforme à l'une quelconque des revendications 20 à 23, de préférence préalablement fixé sur un support insoluble, par la dissociation ultérieure du composé antigène-anticorps formé et par la récupération du peptide  
15 p19 purifié.

42. Utilisation de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou de l'oligomère selon la revendication 15 ou 16 pour la préparation d'une composition immunogène susceptible d'induire une réponse immune contre une infection à *Plasmodium*.

43. Composition de vaccin comprenant à titre de principes actifs  
20 un mélange d'une protéine conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 13 et soit de la p42 correspondante, celle-ci étant le cas échéant déletée de ses parties les moins conservées, soit d'une autre protéine recombinante, de type p19 ou p42, provenant d'un parasite  
25 homologue de celui dont est issu la susdite protéine.

44. Composition de vaccin selon la revendication 23 caractérisée en ce que son mélange de principes actifs est choisi parmi les mélanges suivant :

- p19 de *P.falciparum* et p19 de *P.vivax*,
- 30 - p19 de *P.falciparum* et p42 de *P.falciparum*,

- p19 de *P.vivax* et p42 de *P.vivax*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables,
- p19 de *P.falciparum* et p42 de *P.falciparum*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables, et p19 de *P.vivax* et  
5 p42 de *P.vivax*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables.

45     Hybridome selon la revendication 40, caractérisé en ce qu'il a été déposé à la CNCM (Paris, France) sous le numéro I-1846, le 14 février 1997.

This Page Blank (uspto)

This Page Blank (uspto)

1/32

FIGURE 1A

Bac 19	E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
	<u>GAA</u>	<u>TTC</u>	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC
PF 19			AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT
Bac 19	S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
	TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
PF 19	TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA
Bac 19	N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
	AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
PF 19	AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT
Bac 19	N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
	AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
PF 19	AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT
Bac 19	S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
	TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
PF 19	TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT
Bac 19	Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	*	*					
	TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA					
PF 19	TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT	TTC	TGC	AGT							

**This Page Blank (uspto)**



2/32

FIGURE 1B

	<i>Site Eco RI</i>																	
	E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N	
Bac 19	GAA	TTC	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	
PF 19			AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT	
	S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L	
Bac 19	TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG	
PF 19	TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA	
	N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C	
Bac 19	AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT	
PF 19	AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT	
	N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D	
Bac 19	AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC	
PF 19	AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT	
	S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S	
Bac 19	TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG	
PF 19	TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT	
	Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	S	S	N	F	L	G	I	
Bac 19	TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TCC	TCT	AAC	TTC	TTG	GGC	ATC	
PF 19	TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT	TTC	TGC	AGT	TCC	TCT	AAC	TTC	TTA	GGA	ATA	
	S	F	L	L	I	L	M	L	I	L	Y	S	F	I	*	*		
Bac 19	TCG	TTC	TTG	TTG	ATC	CTC	ATG	TTG	ATC	TTG	TAC	AGC	TTC	ATT	TAA	TAA		
PF 19	TCA	TTC	TTA	TTA	ATA	CTC	ATG	TTA	ATA	TTA	TAC	AGT	TTC	ATT				

This Page Blank (uspto)

3/32

ATG	AAG	GCG	CTA	CTC	TTT	TTG	TTC	TCT	TTC	ATT	TTT	TTC	GTT	ACC	AAA	TGT
M	K	A	L	L	F	L	F	S	F	I	F	F	V	T	K	C
CAA	TGT	GAA	ACA	GAA	AGT	TAT	AAG	CAG	CTT	GTA	GCC	AAC	GTG	GAC	GAA	TTC
Q	C	E	T	E	S	Y	K	Q	L	V	A	N	V	D	<u>E</u>	<u>F</u>
AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	TCT	GGC
N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N	S	G
TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG	AAC	TAC
C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L	N	Y
AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT	AAC	GAG
K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C	N	E
AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC	TCG	GGC
N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D	S	G
AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG	TAC	CCG
S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S	Y	P
CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA							
L	F	D	G	I	F	C	S	*	*							

FIGURE 1C

This Page Blank (uspto)

4 / 32

GAA E	ACA T	GAA E	AGT S	TAT Y	AAG K	CAG Q	CTT L	GTA V	GCC A	AAC N	GTG V	GAC D	GAA <u>E</u>	TTC <u>F</u>			
AAC N	ATC I	TCG S	CAG Q	CAC H	CAA Q	TGC C	GTG V	AAA K	AAA K	CAA Q	TGT C	CCC P	GAG E	AAC N	TCT S	GGC G	
TGT C	TTC F	AGA R	CAC H	TTG L	GAC D	GAG E	AGA R	GAG E	GAG E	TGT C	AAA K	TGT C	CTG L	CTG L	AAC N	TAC Y	
AAA K	CAG Q	GAG E	GGC G	GAC D	AAG K	TGC C	GTG V	GAG E	AAC N	CCC P	AAC N	CCG P	ACC T	TGT C	AAC N	GAG E	
AAC N	AAC N	GGC G	GGC G	TGT C	GAC D	GCA A	GAC D	GCC A	AAA K	TGC C	ACC T	GAG E	GAG E	GAC D	TCG S	GGC G	
AGC S	AAC N	GGC G	AAG K	AAA K	ATC I	ACG T	TGT C	GAG E	TGT C	ACC T	AAA K	CCC P	GAC D	TCG S	TAC Y	CCG P	
CTG L	TTC F	GAC D	GGC G	ATC I	TTC F	TGC C	AGC S	TAA *	TAA *								

FIGURE 1D

This Page Blank (uspto)

5/32



FIGURE 2

**This Page Blank (uspto)**



6/32

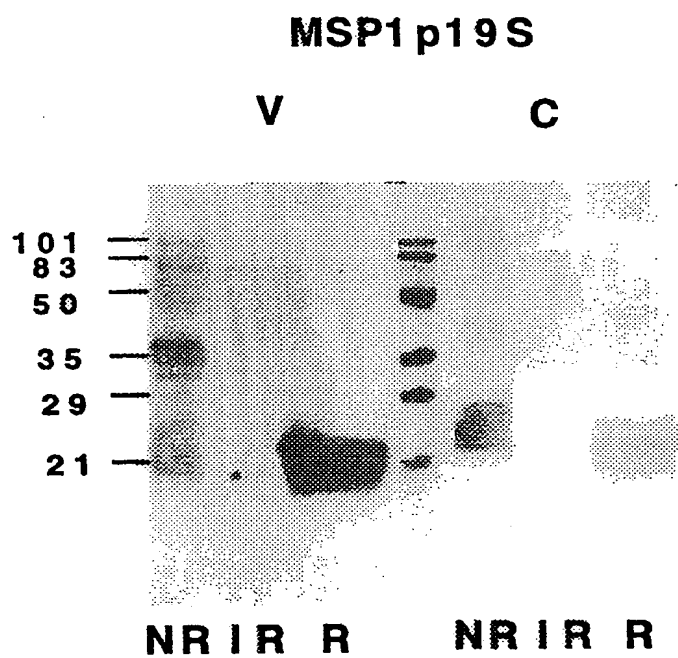


FIGURE 2B

**This Page Blank (uspto)**

7/32

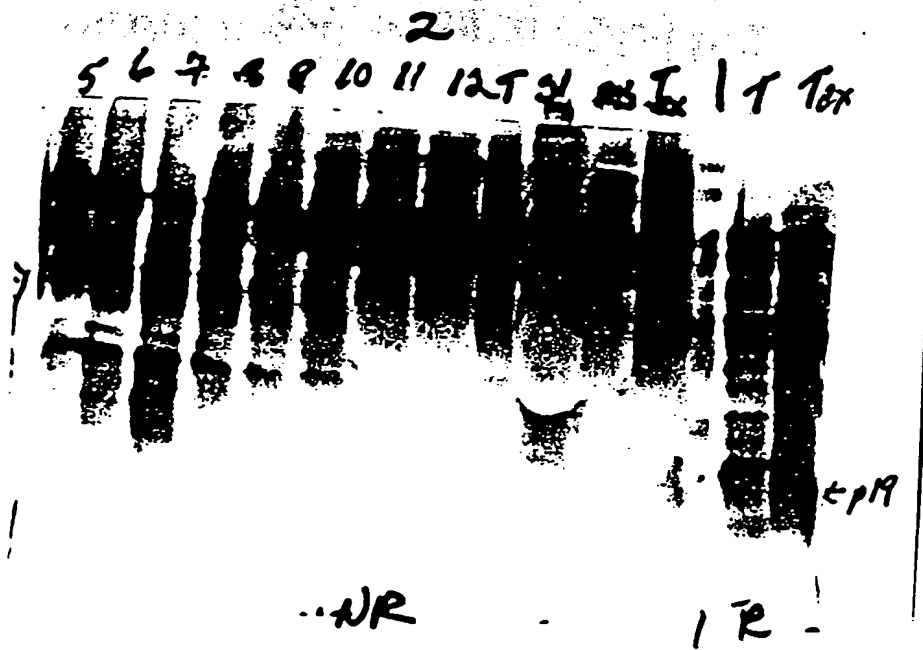


FIGURE 3

This Page Blank (uspto)

INHIBITION D'ELISA PAR DES ANTIGENES MSP-1 P42 ET P19 DE P. VIVAX

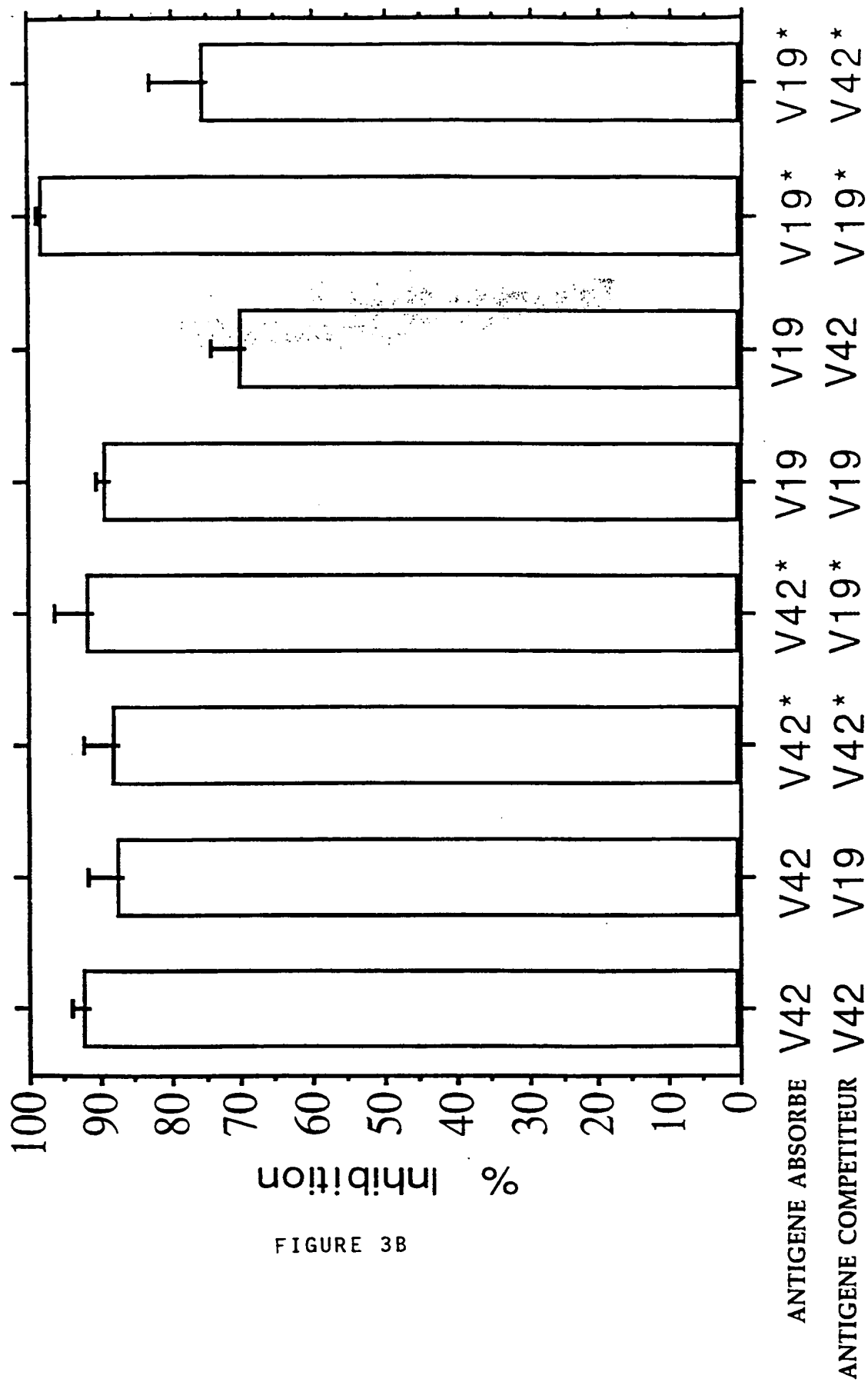


FIGURE 3B

This Page Blank (uspto)

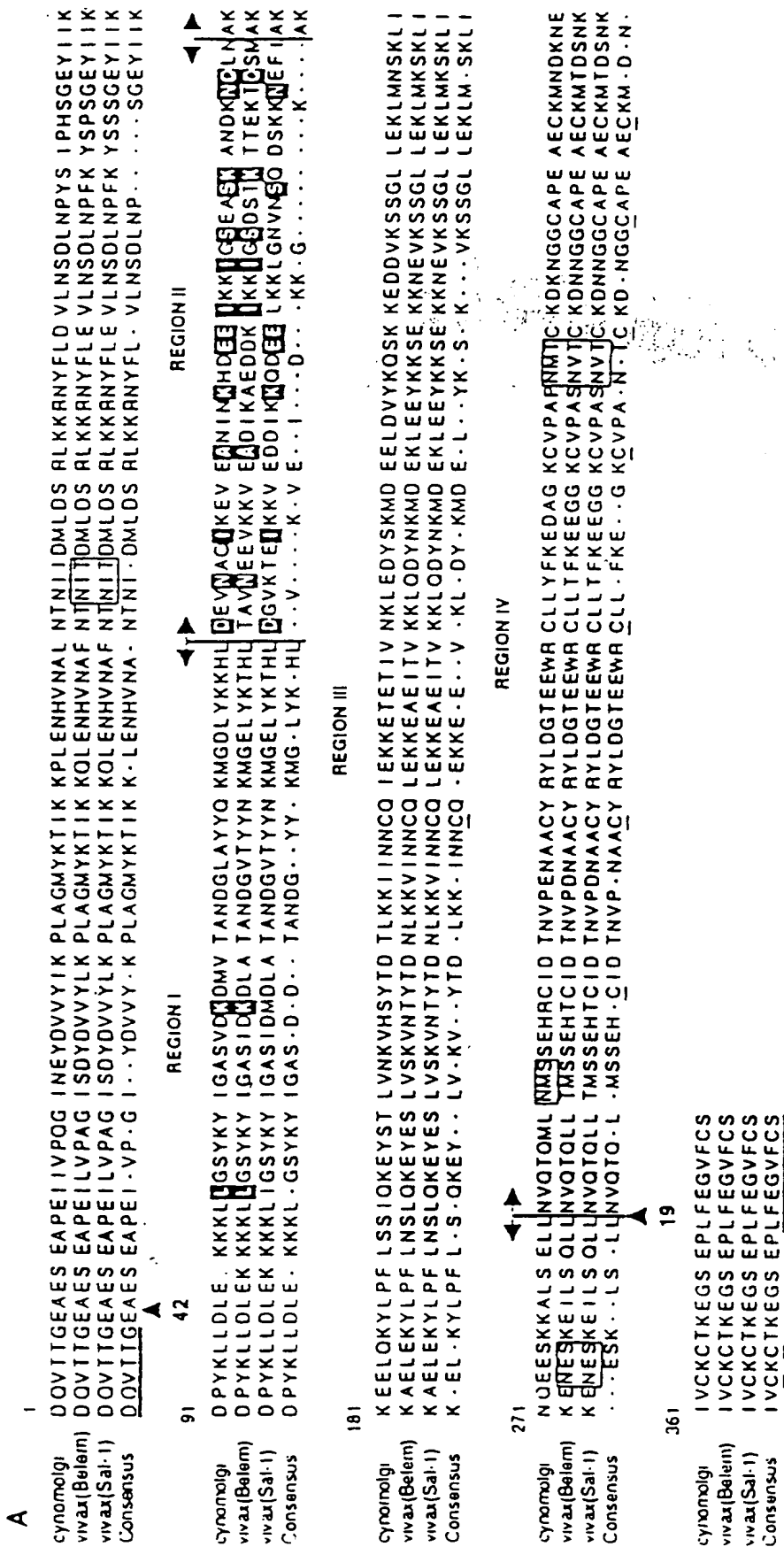


FIGURE 4

This Page Blank (uspto)



10/32

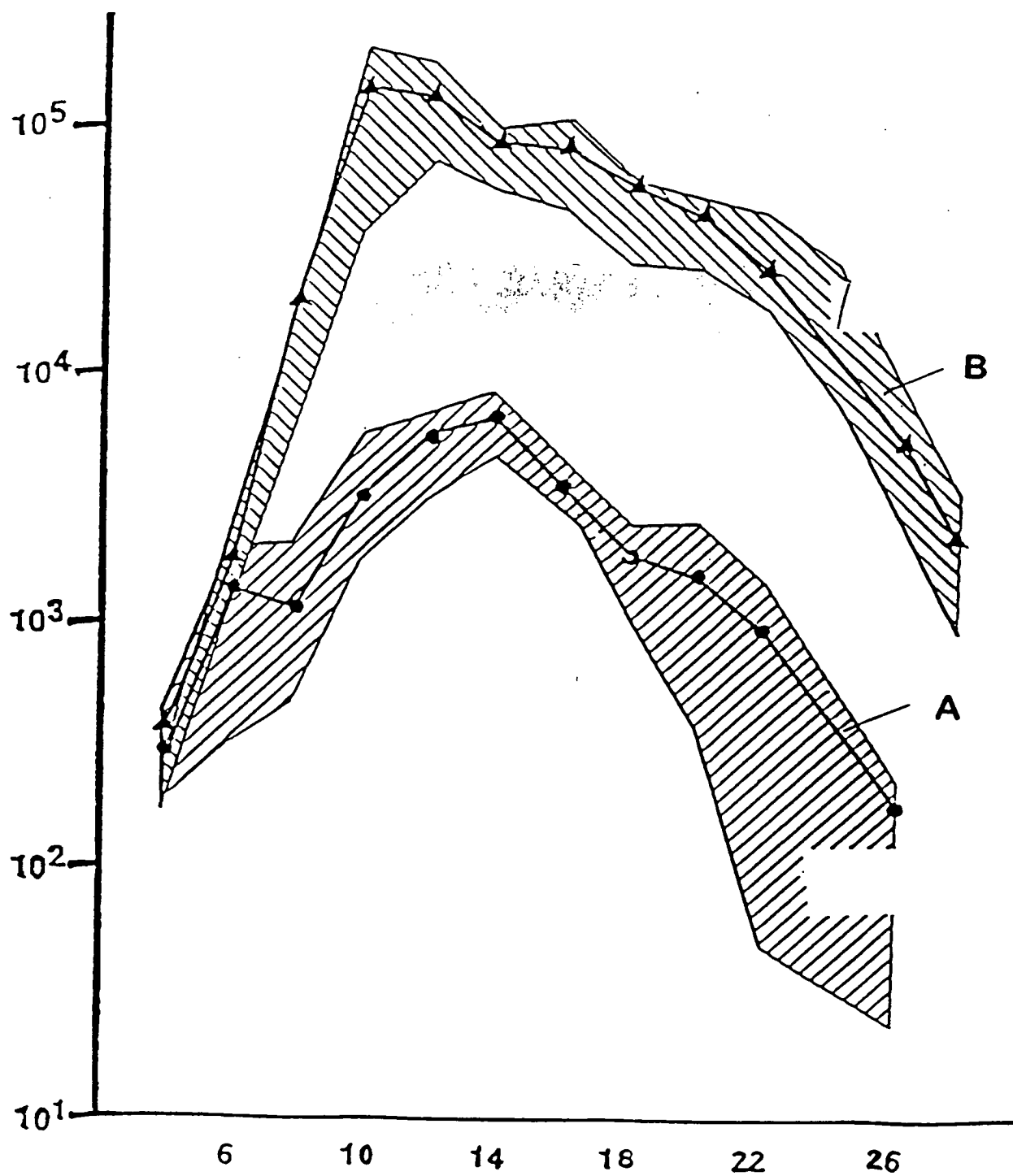


FIGURE 5

This Page Blank (uspto)

11/32

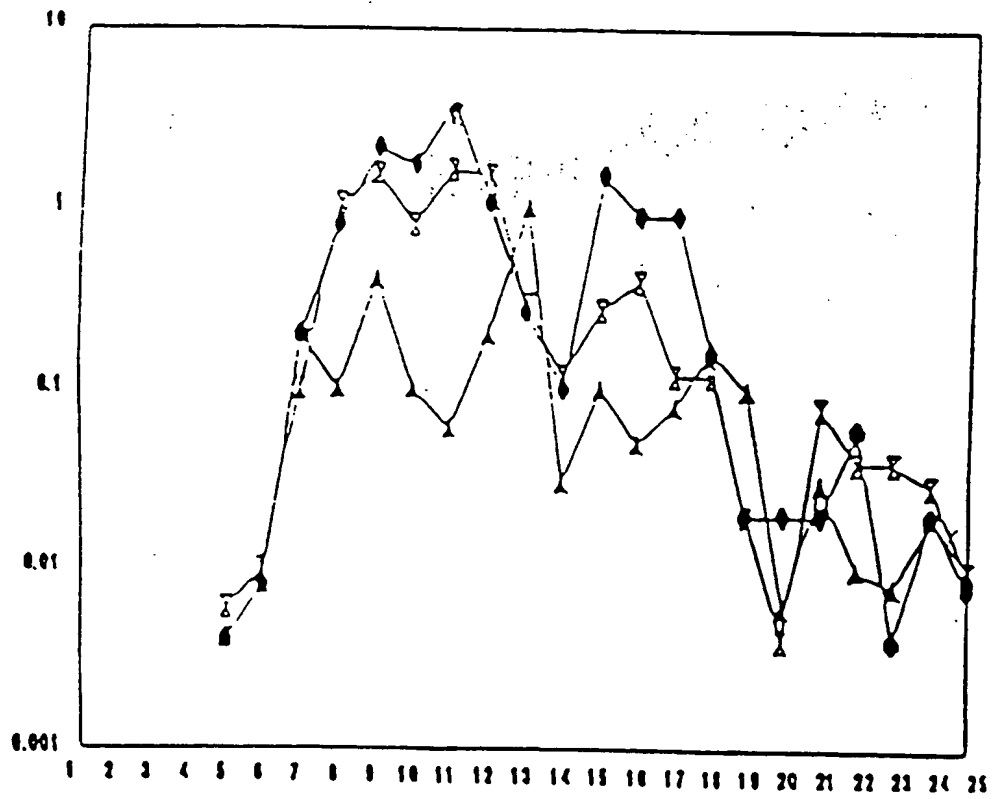


FIGURE 6A

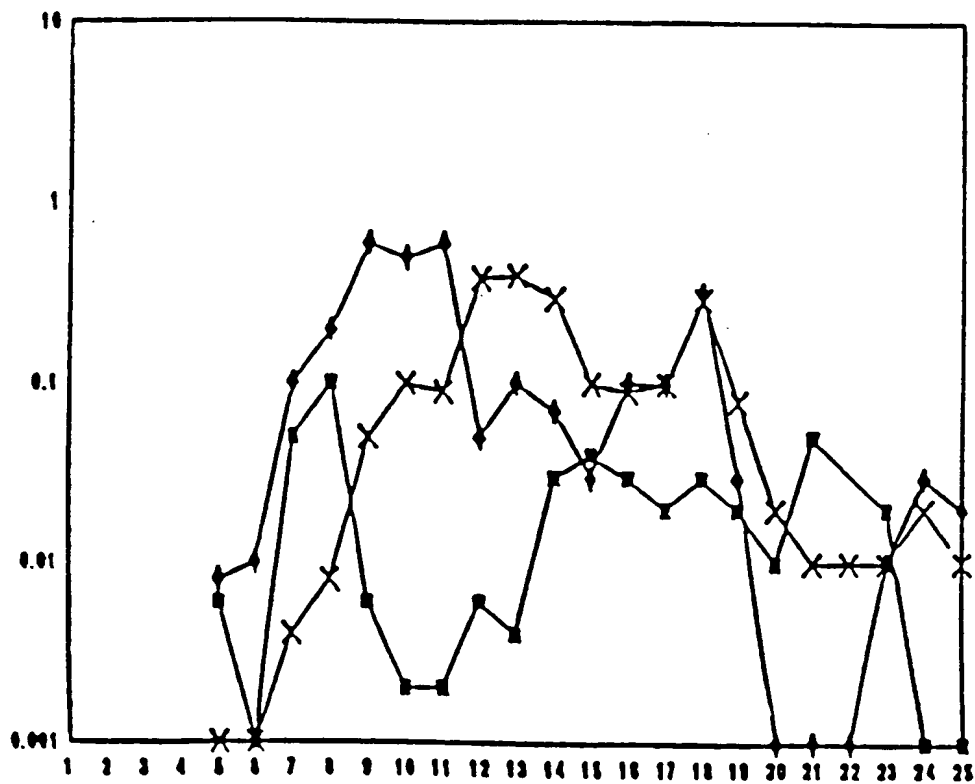


FIGURE 6B

This Page Blank (uspto)

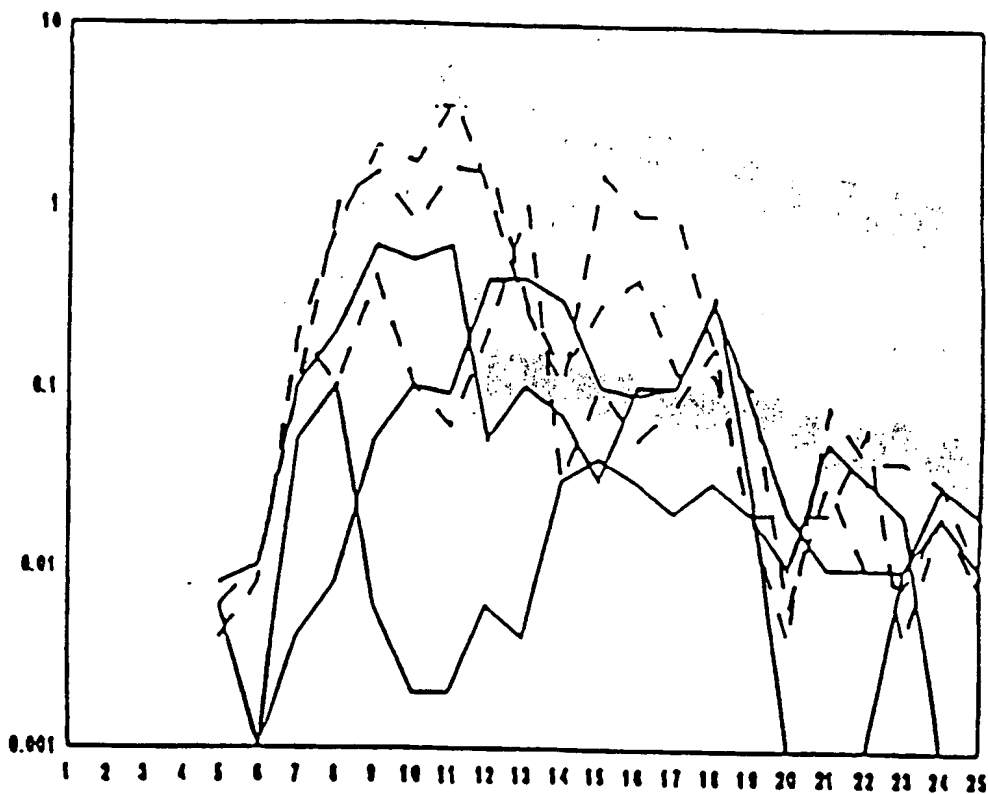


FIGURE 6C

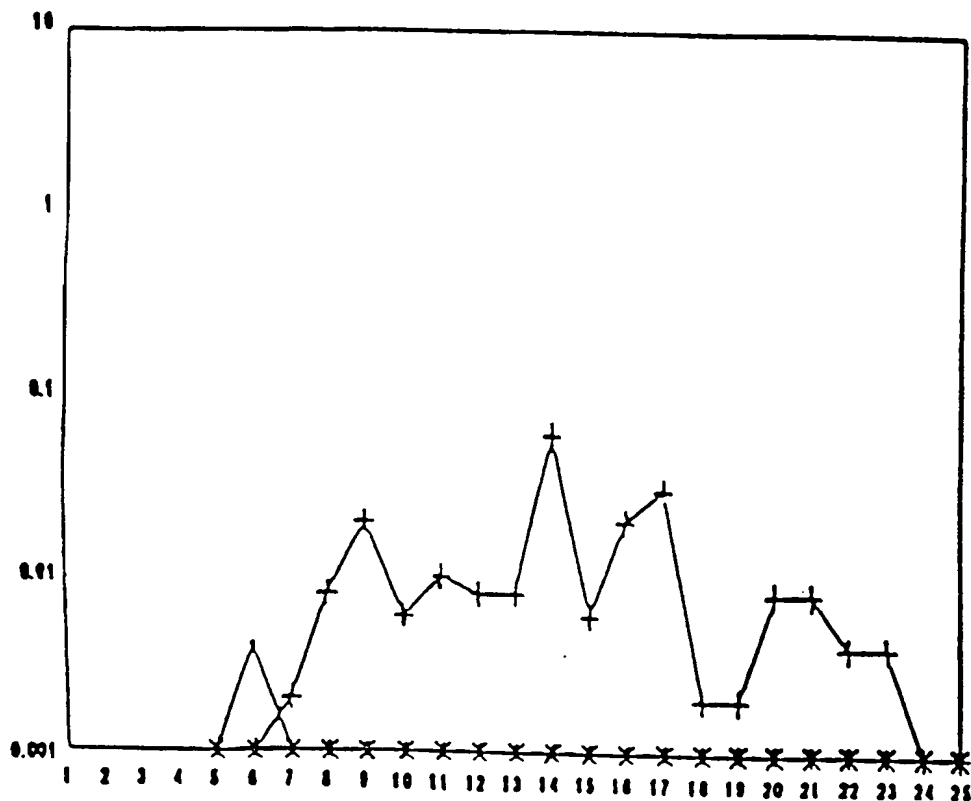


FIGURE 6D

This Page Blank (uspto)

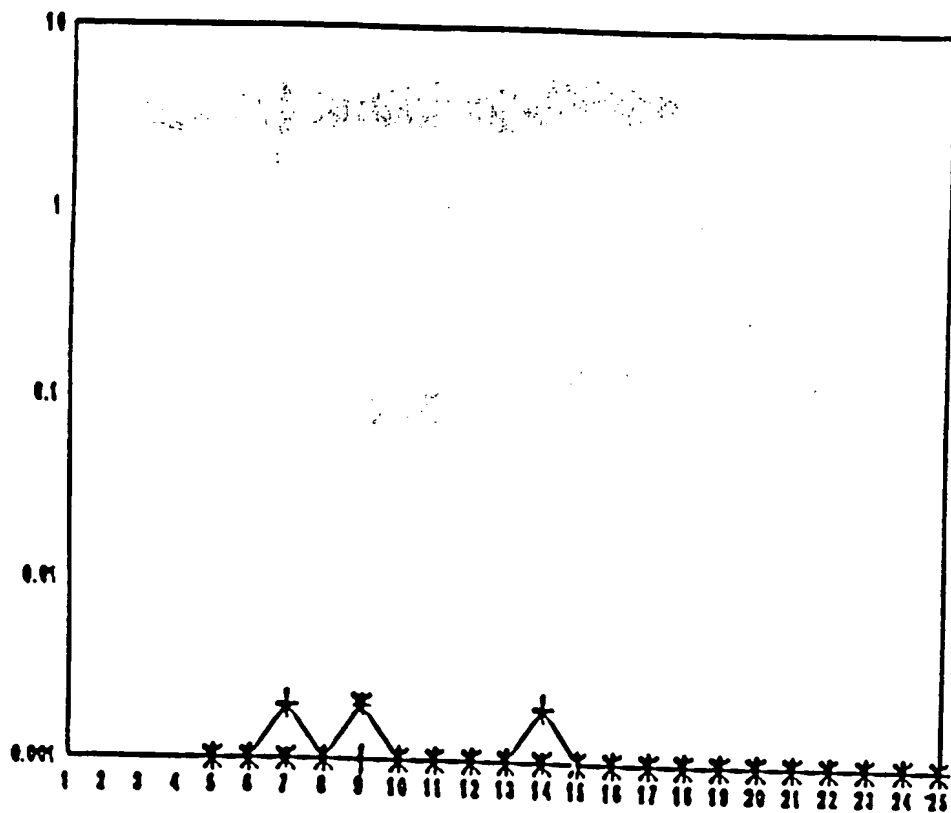


FIGURE 6E

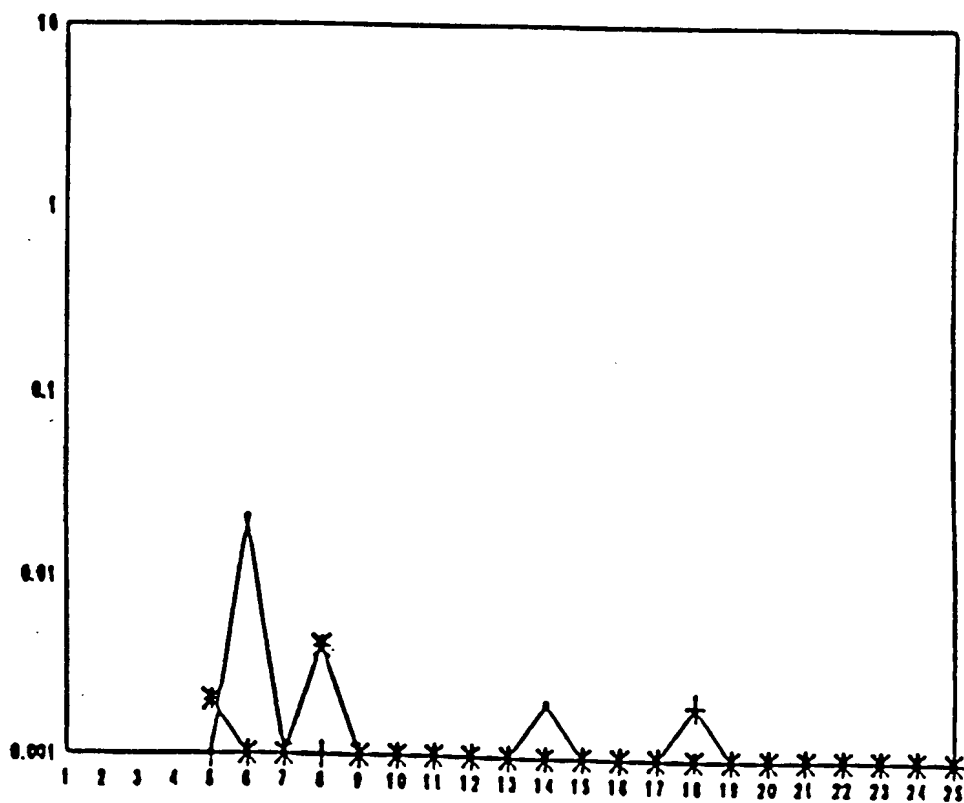


FIGURE 6F

**This Page Blank (uspto)**



		Year		Month		Day		Jours post-infection	
		95	95	95	95	95	95	95	95
		7	7	7	7	7	7	7	7
		19	20	21	22	23	24	25	26
		5	6	7	8	9	10	11	12
		13	14	15	16	17	18	19	20
		21	22	23	24	25	26	27	28
		29	30	31	32	33	34	35	36

[illegible]

	T425	.06	-	.05	0.1	.006	.002	.002	.006	.004	.03	.04	.03	.02	.03	.07	.01	.05	ND	.02	-	-	.004	.004	.01	.06	.04	.03	.008
	T436	-	-	.004	.008	0.05	0.1	0.09	0.39	0.4	0.3	0.1	0.09	0.1	.3	.08	.02	.01	.01	.01	.02	.01	.01	.008	.02	.004	.008	.004	.004
Eau physiologique, RCA/FIA	T438	.008	0.01	0.1	0.2	0.6	0.5	.06	0.05	0.1	0.07	0.03	0.1	0.1	.32	.03	-	-	-	.01	.03	.02	.04	.01	.05	.004	.008	-	.004

	T437	.004	.008	0.2	0.1	0.4	0.1	0.06	0.2	1.0	0.03	0.1	0.05	0.08	.17	.1	.006	.03	.01	.008	.02	.01	.008	.01	.01	.008	.01	-	-	
Contrôles																														
Non-vaccinés	T440	.006	.01	0.1	1.04	1.5	1.8	1.6	1.5	0.3	0.12	0.28	0.4	0.12	.12	.02	.004	.08	.04	.03	.01	.01	.04	.02	.005	.03	.004	.004	.004	
	T441	.004	.008	0.2	0.8	2.1	1.7	3.8	1.04	0.27	0.1	1.5	0.9	0.9	.16	.02	.02	.02	.06	.004	.02	.008	.01	.008	.004	.004	.008	.008	.004	.004

— = Absence de parasites dans 400 champs microscopiques

This Page Blank (uspto)

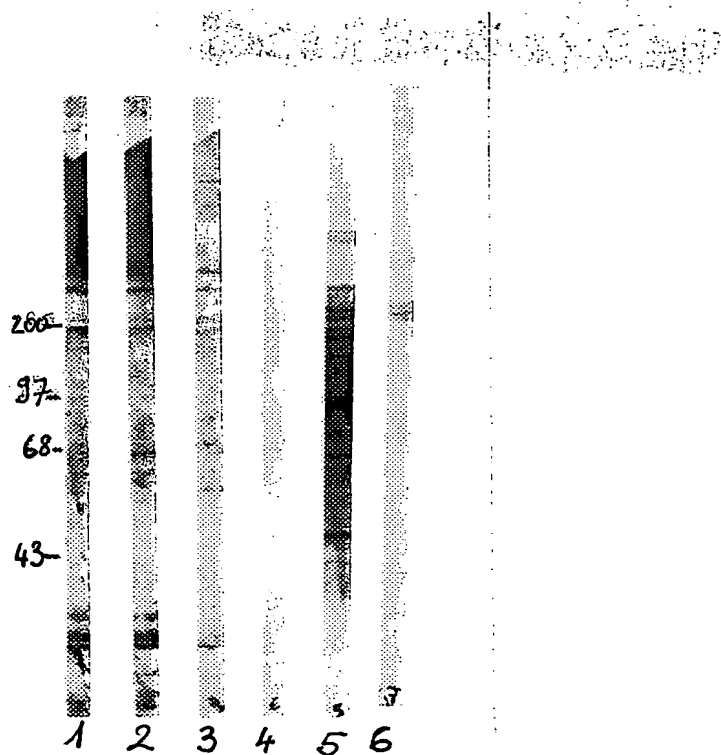


FIGURE 7

This Page Blank (uspto,

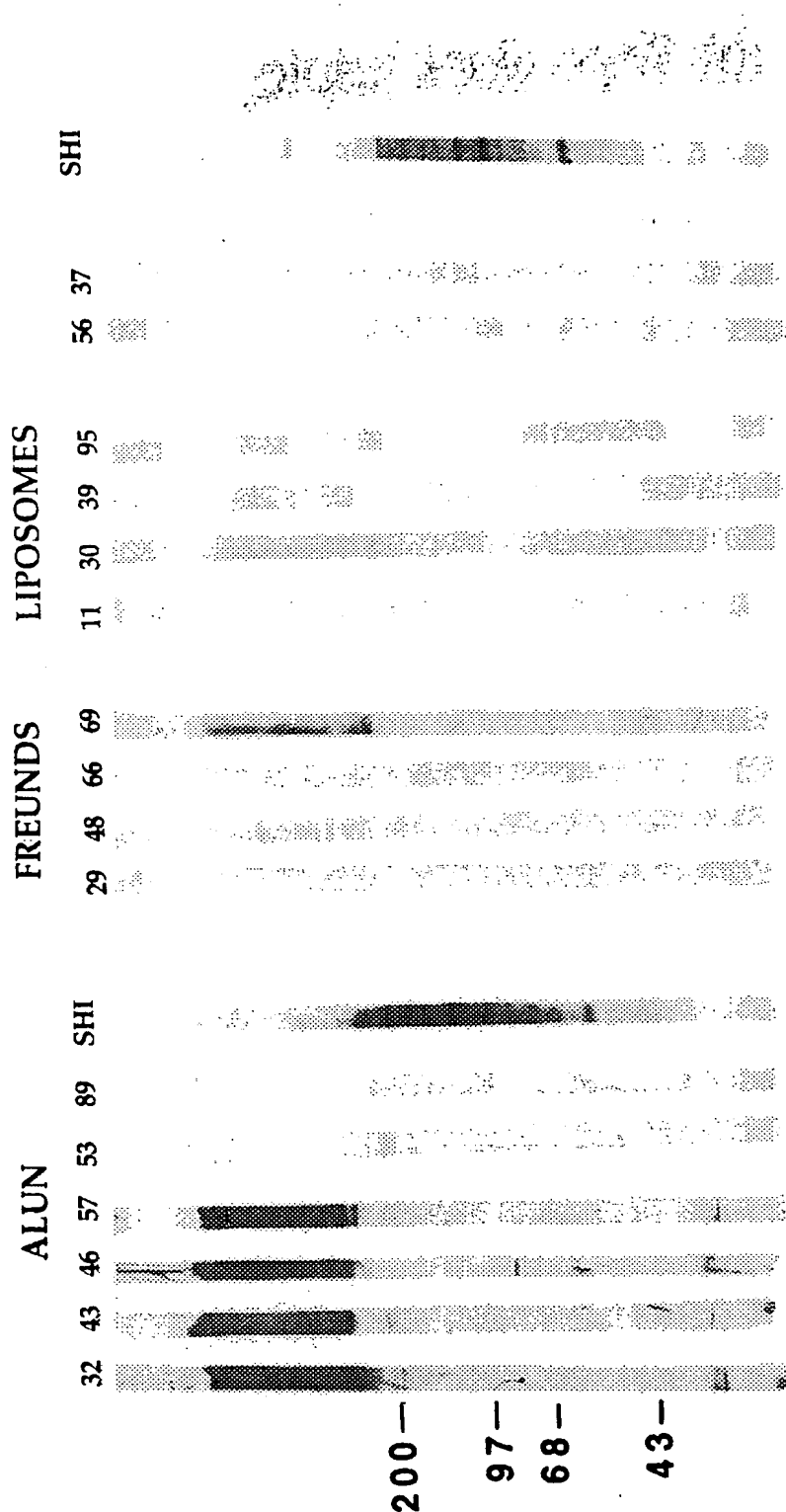
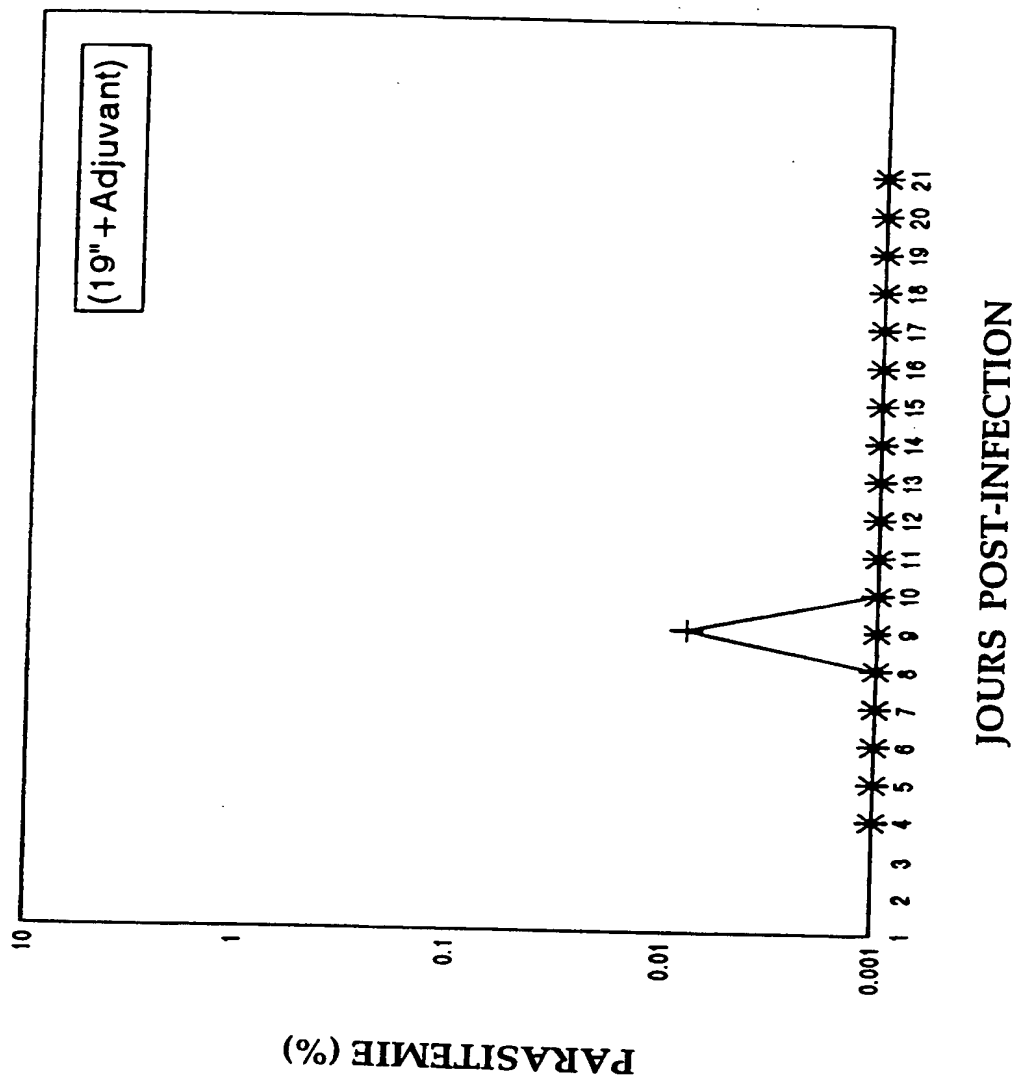


FIGURE 7B

This Page Blank (uspto)

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

FIGURE 8A

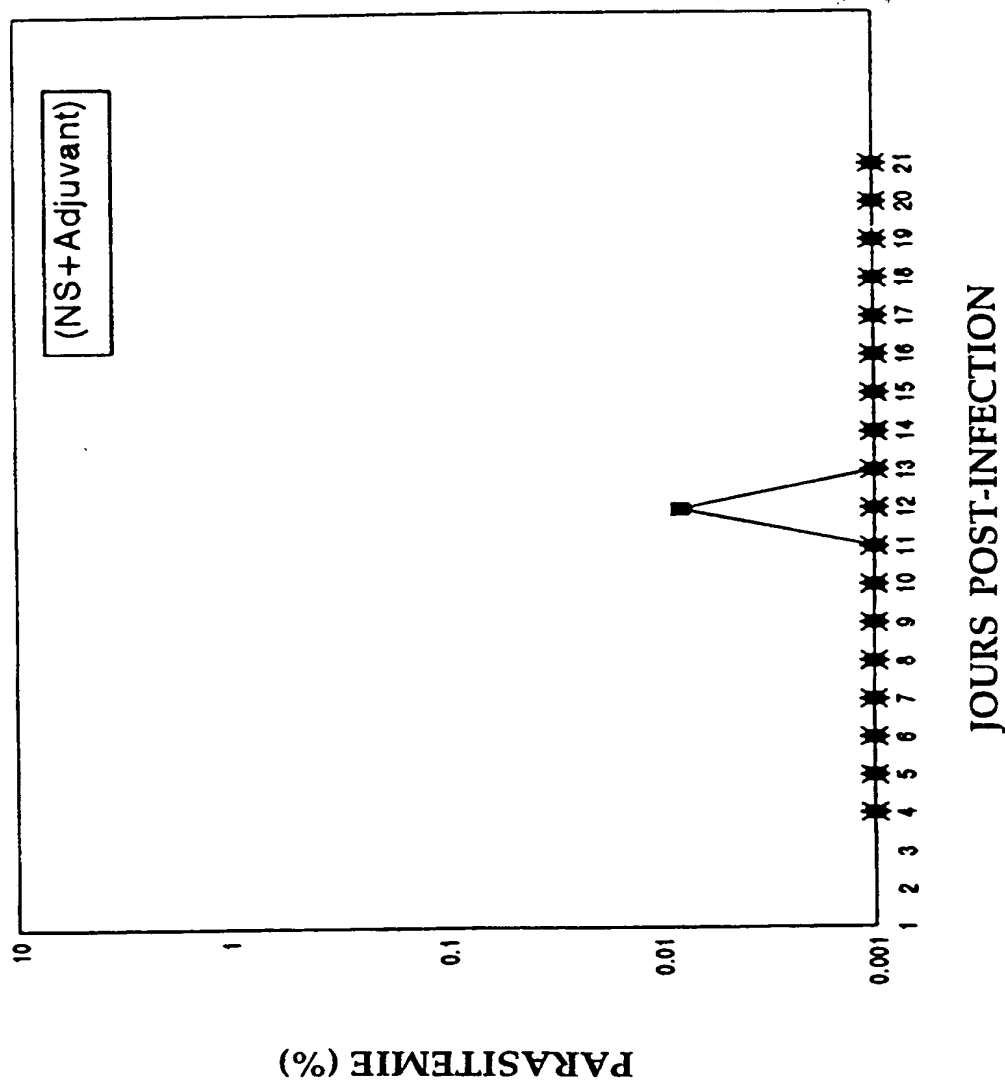


This Page Blank (uspto)



Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

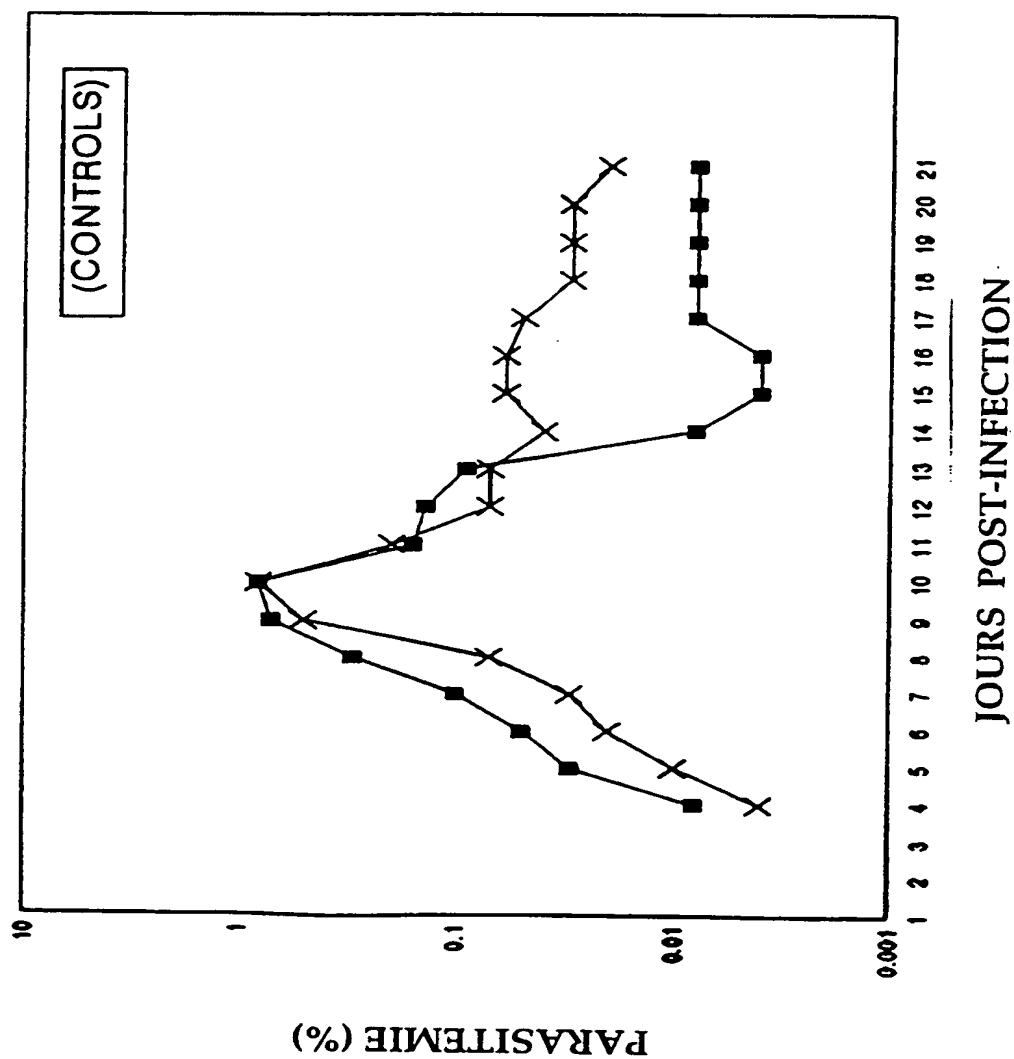
FIGURE 8B



This Page Blank (uspto)

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

FIGURE 8C



**This Page Blank (uspto)**

20/32

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi*  
chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

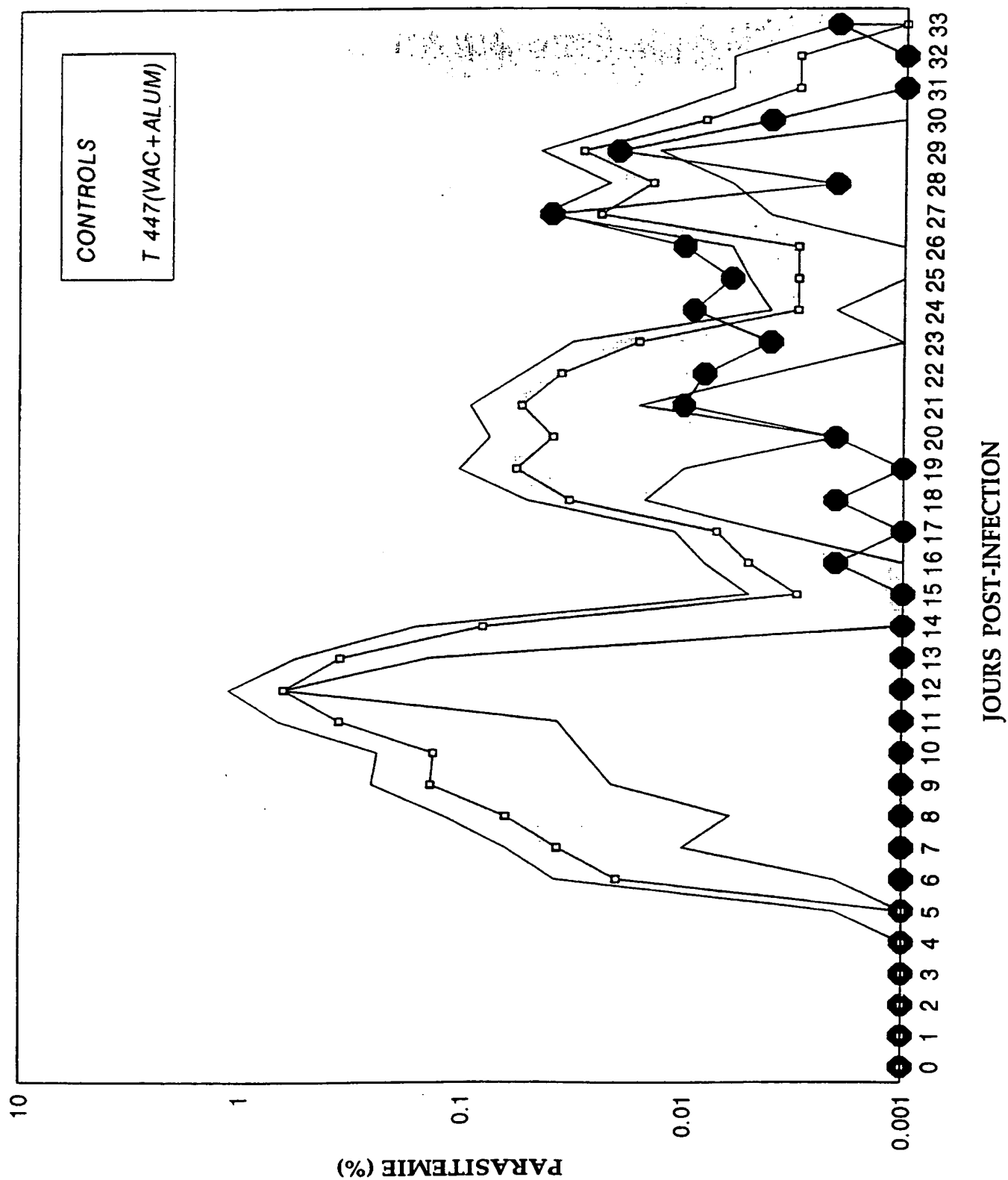
Year	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
Month	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Jours post-infection	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Days after challenge	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Vaccination p19																		
T 426	-	-	-	-	-	.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 427	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrôles Eau physiologique, FCA/FIA																		
T 436	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 425	-	-	-	-	-	-	-	-	.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 438	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrôles Non-vaccinés																		
T 448	.008	.03	.05	0.1	0.3	0.7	0.8	.16	.14	.09	.008	.004	.004	.008	.008	.008	.008	.008
T 449	.004	.01	.02	.03	0.07	0.5	0.8	0.2	.07	.07	.04	.06	.06	.05	.03	.03	.03	.02

- = Absence de parasites dans 400 champs microscopiques

FIGURE 8 D

This Page Blank (uspto)

FIGURE 9A

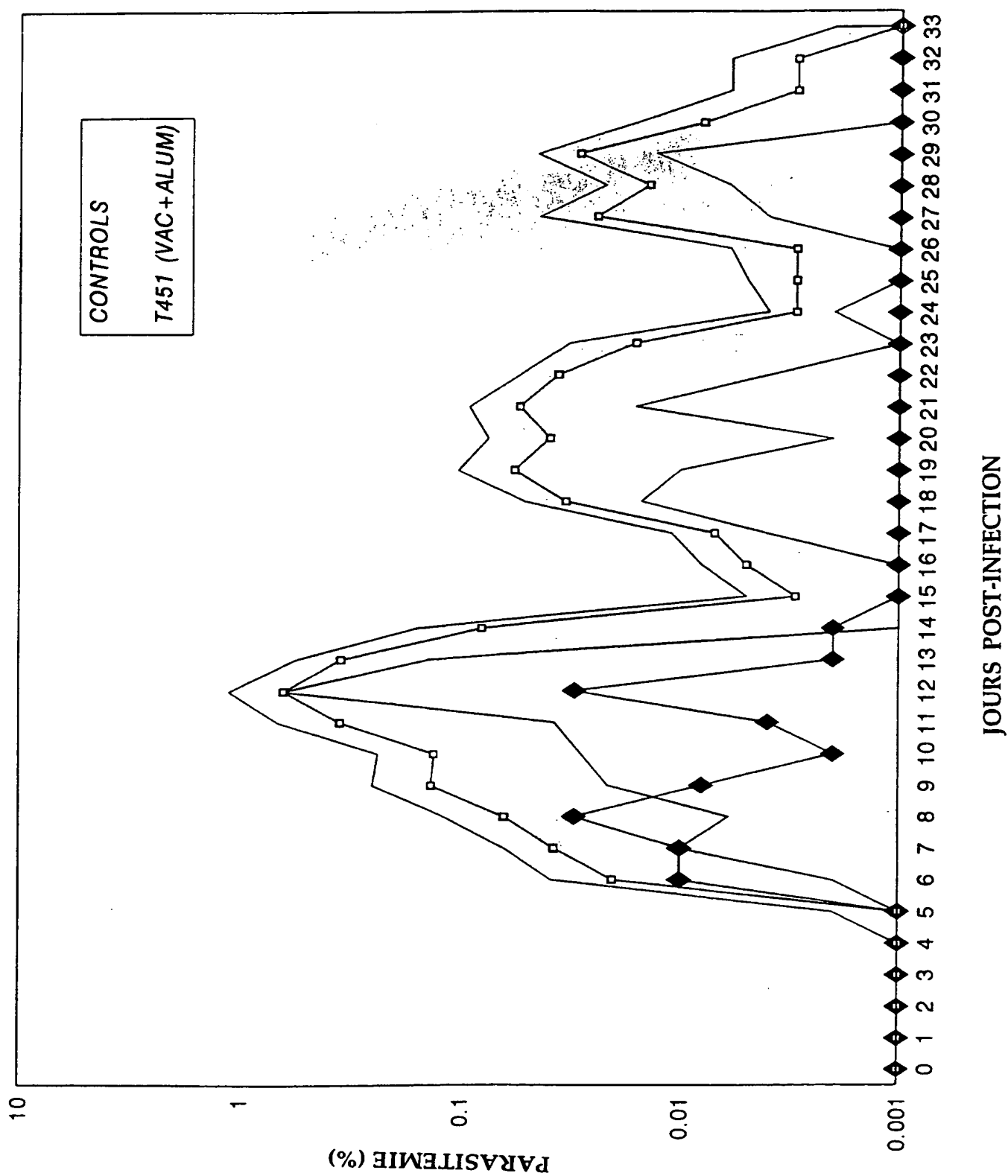


This Page Blank (uspto)



22/32

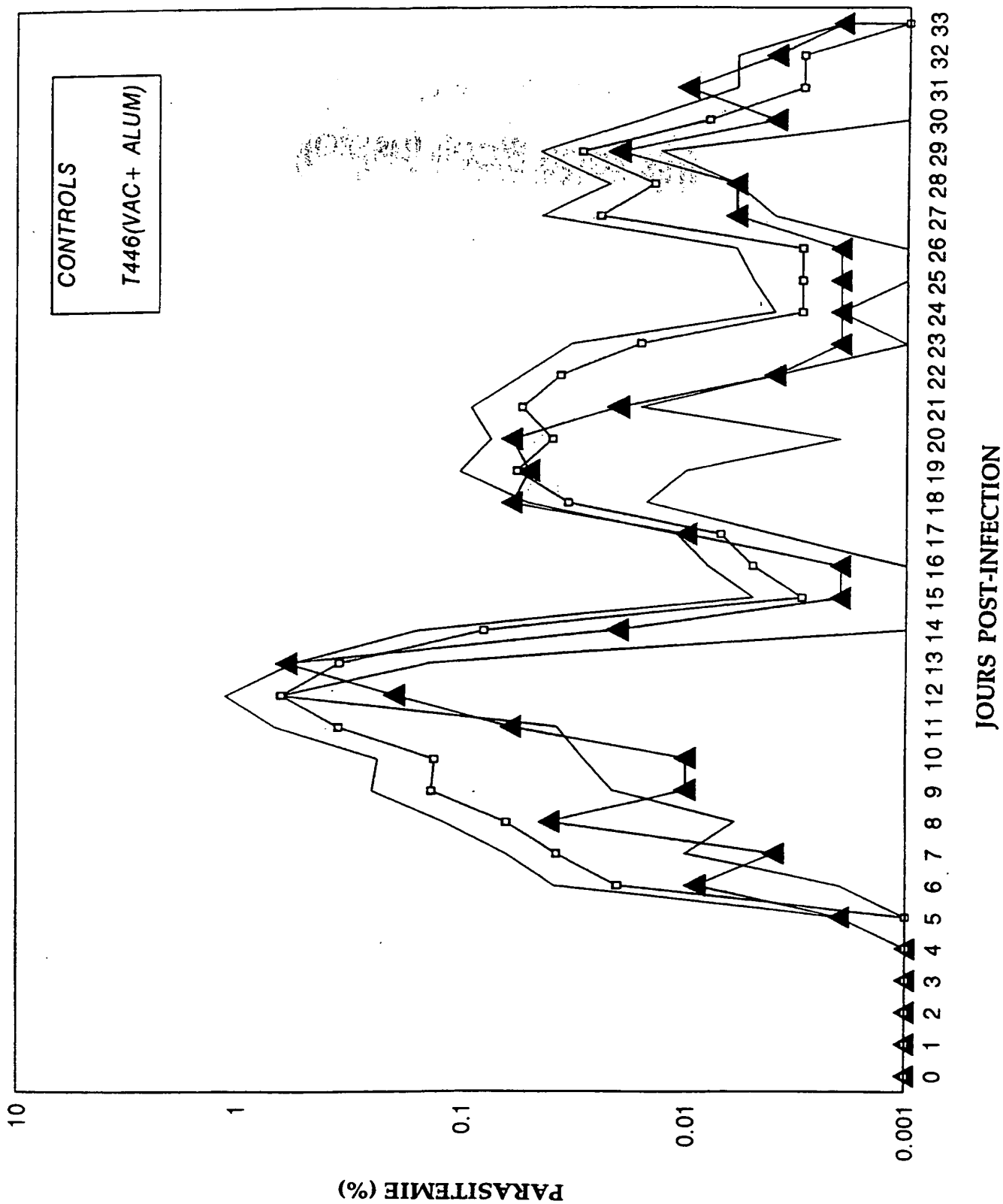
FIGURE 9B



This Page Blank (uspto)

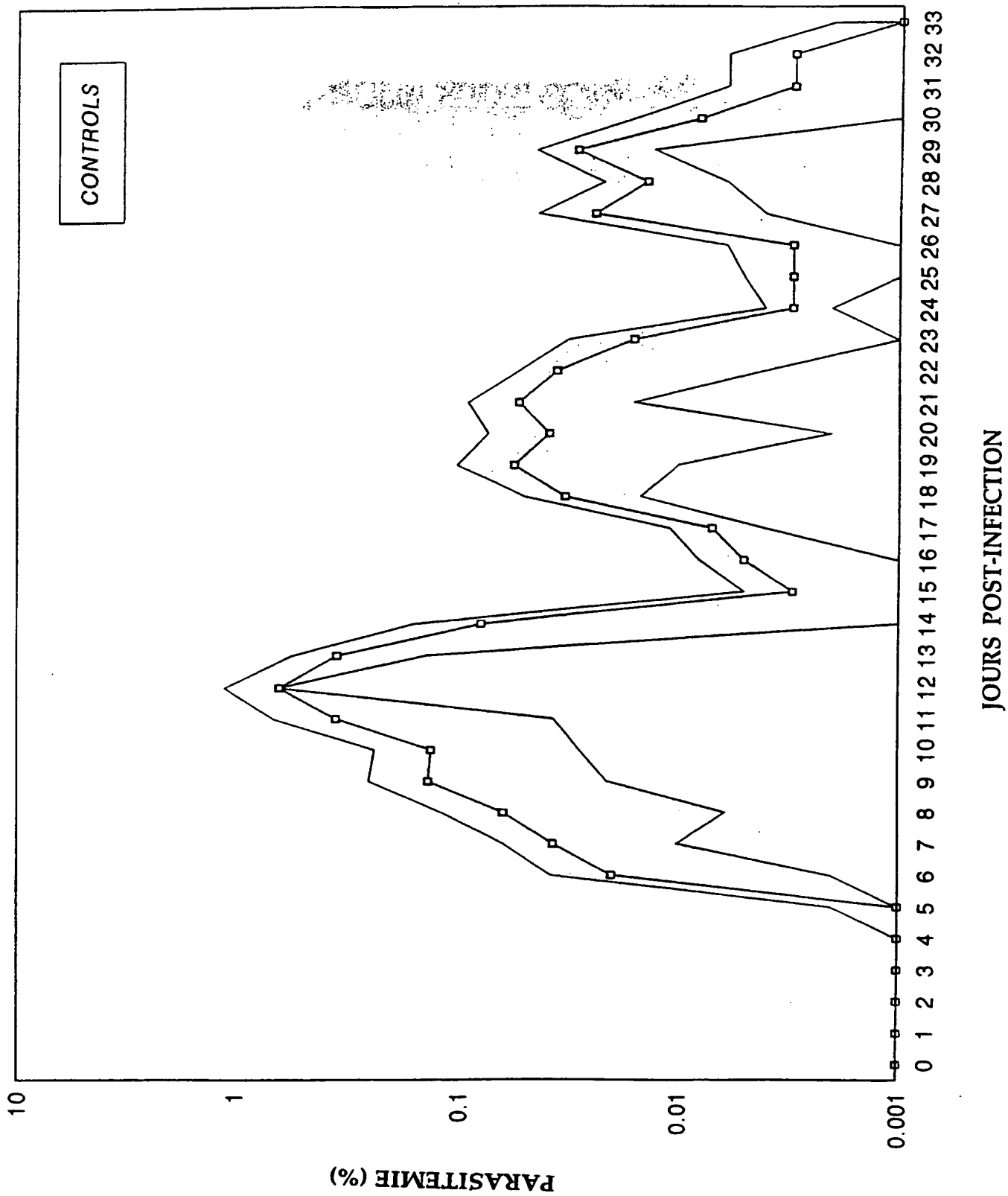
23/32

FIGURE 9C



This Page blank (uspto,

FIGURE 9D



**This Page Blank (uspto,**



**This Page Blank (uspto)**



ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*

MSP-1 p19 VACCINATION AVEC ALUM

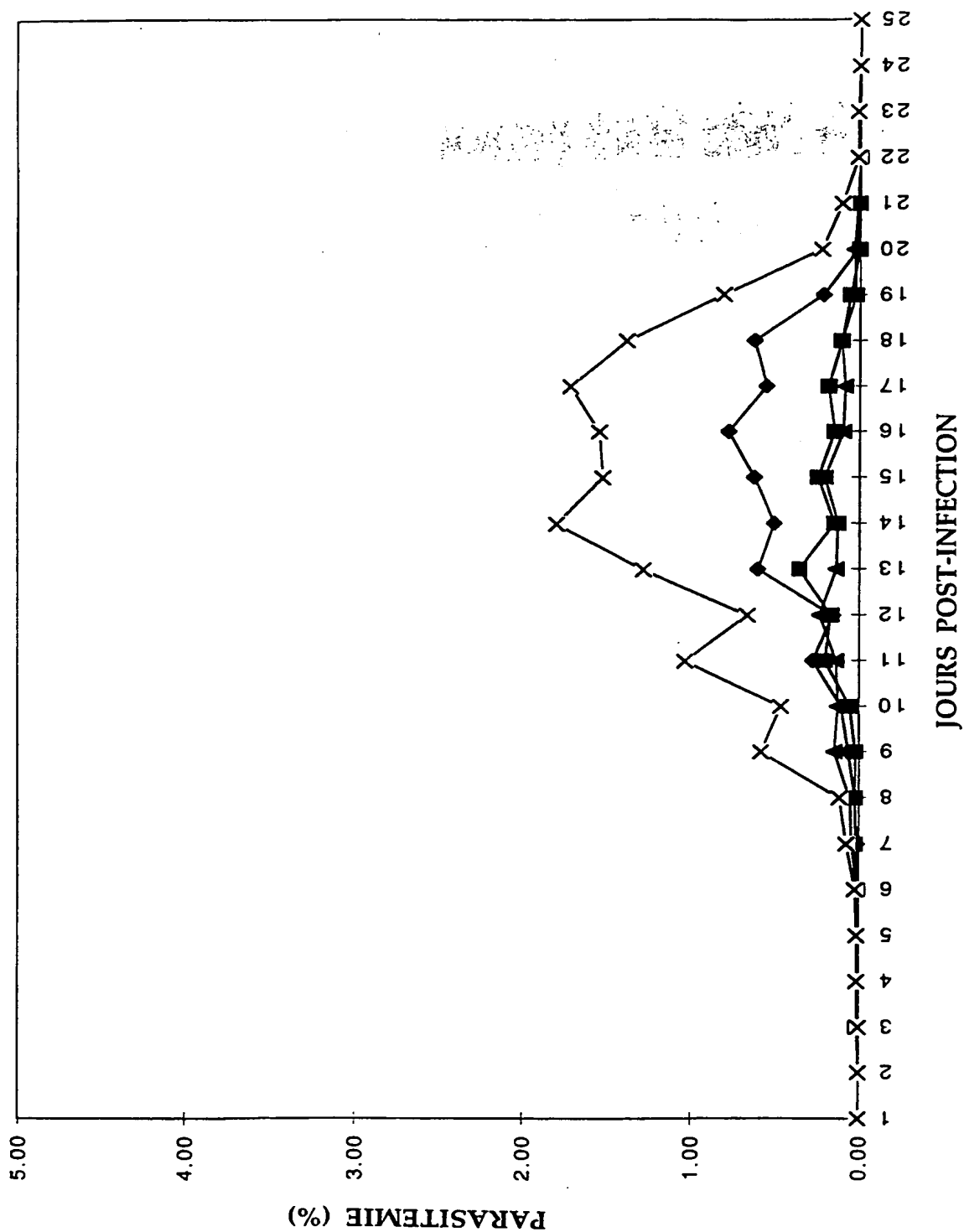
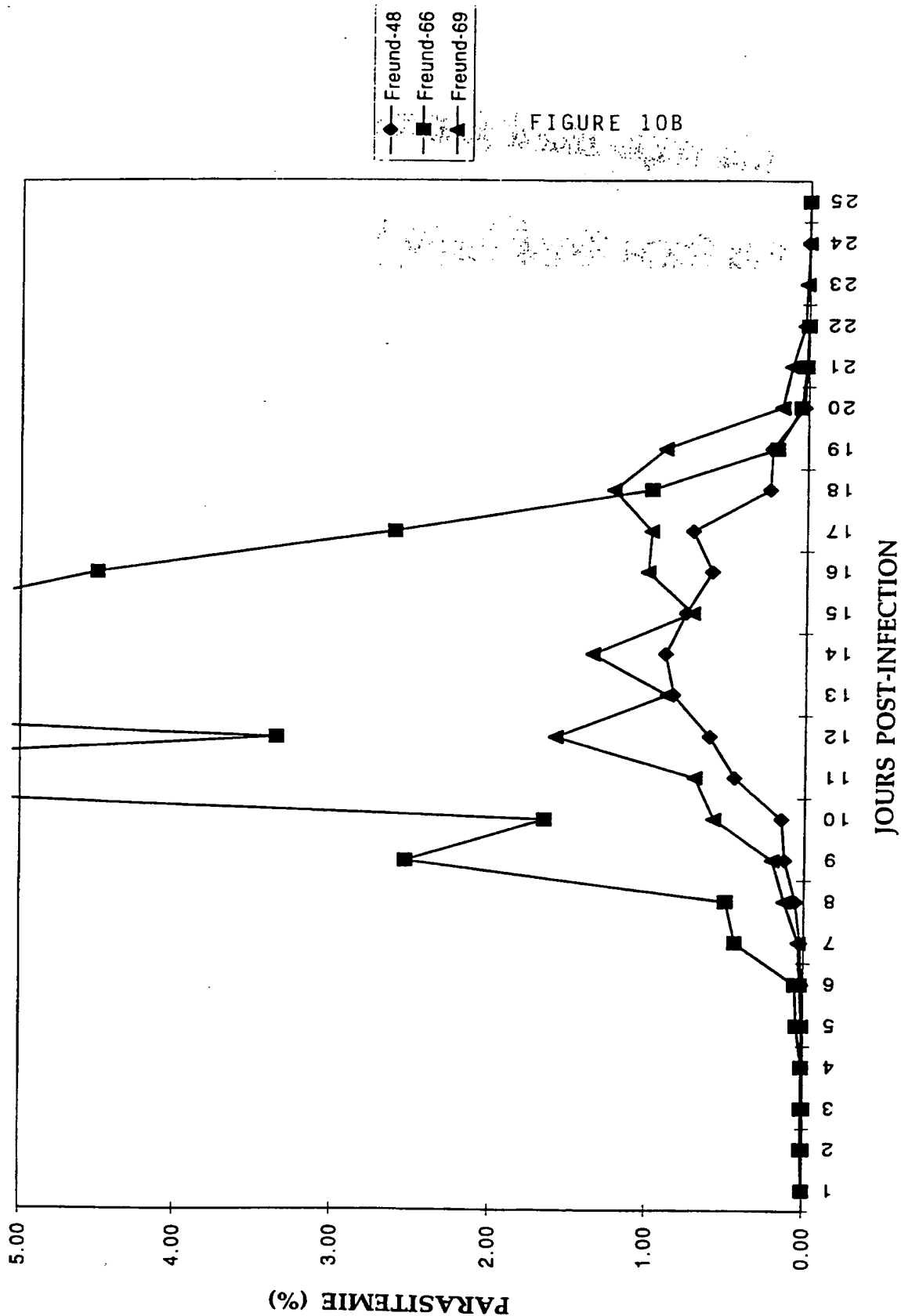


FIGURE 10A

This Page Blank (uspto)

ESSAI DE VACCINATION PLASMODIUM FALCIPARUM CHEZ LE SINGE ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS

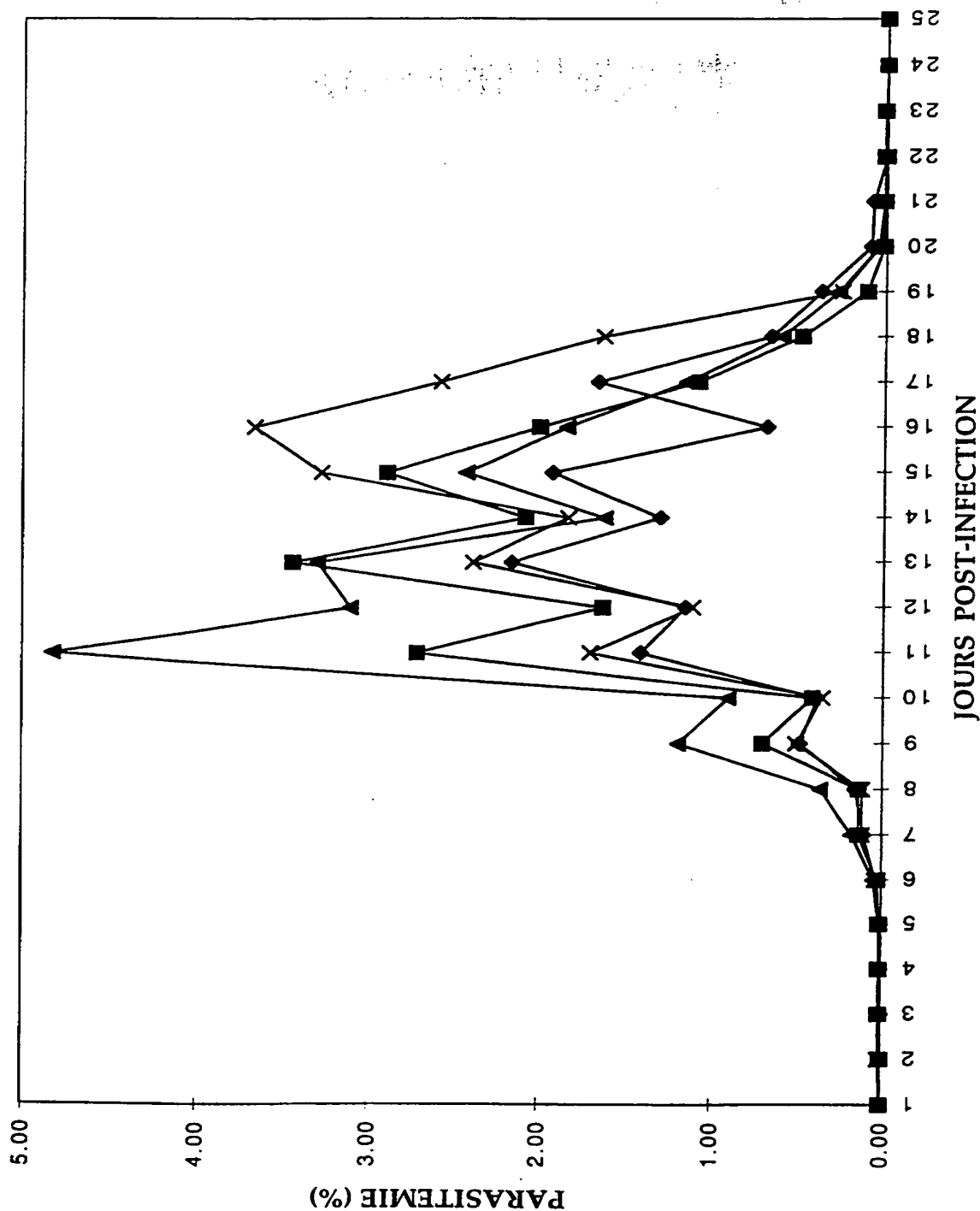
MSP-1 p19 VACCINATION AVEC FREUNDS



This Page Blank (uspto)

ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*

MSP-1 p19 VACCINATION AVEC LIPOSOMES



**This Page Blank (uspto)**

29/32

ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*

CONTROLE ALUN

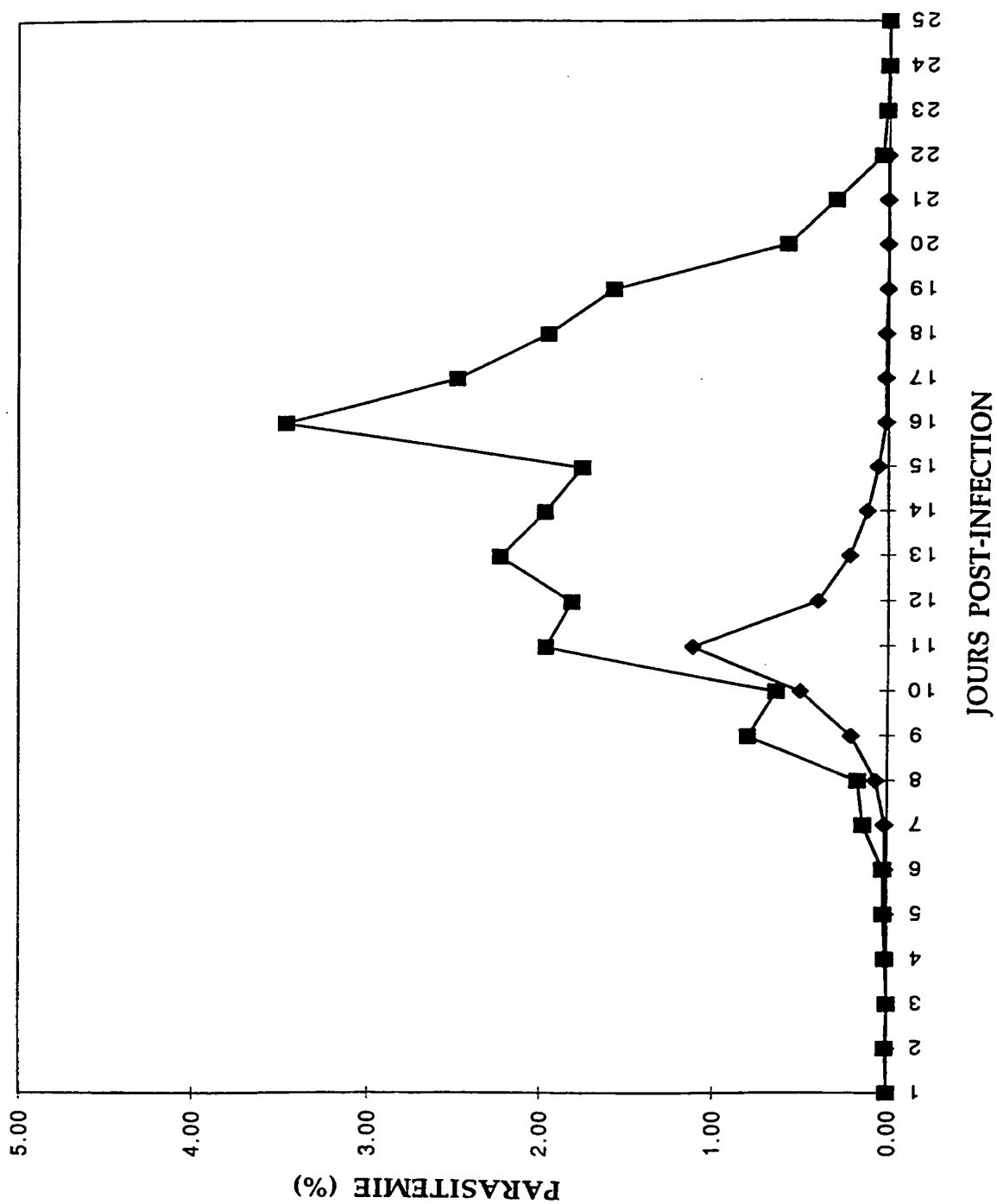


FIGURE 10D

This Page Blank (usptc,



ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*

CONTROLE FREUNDS

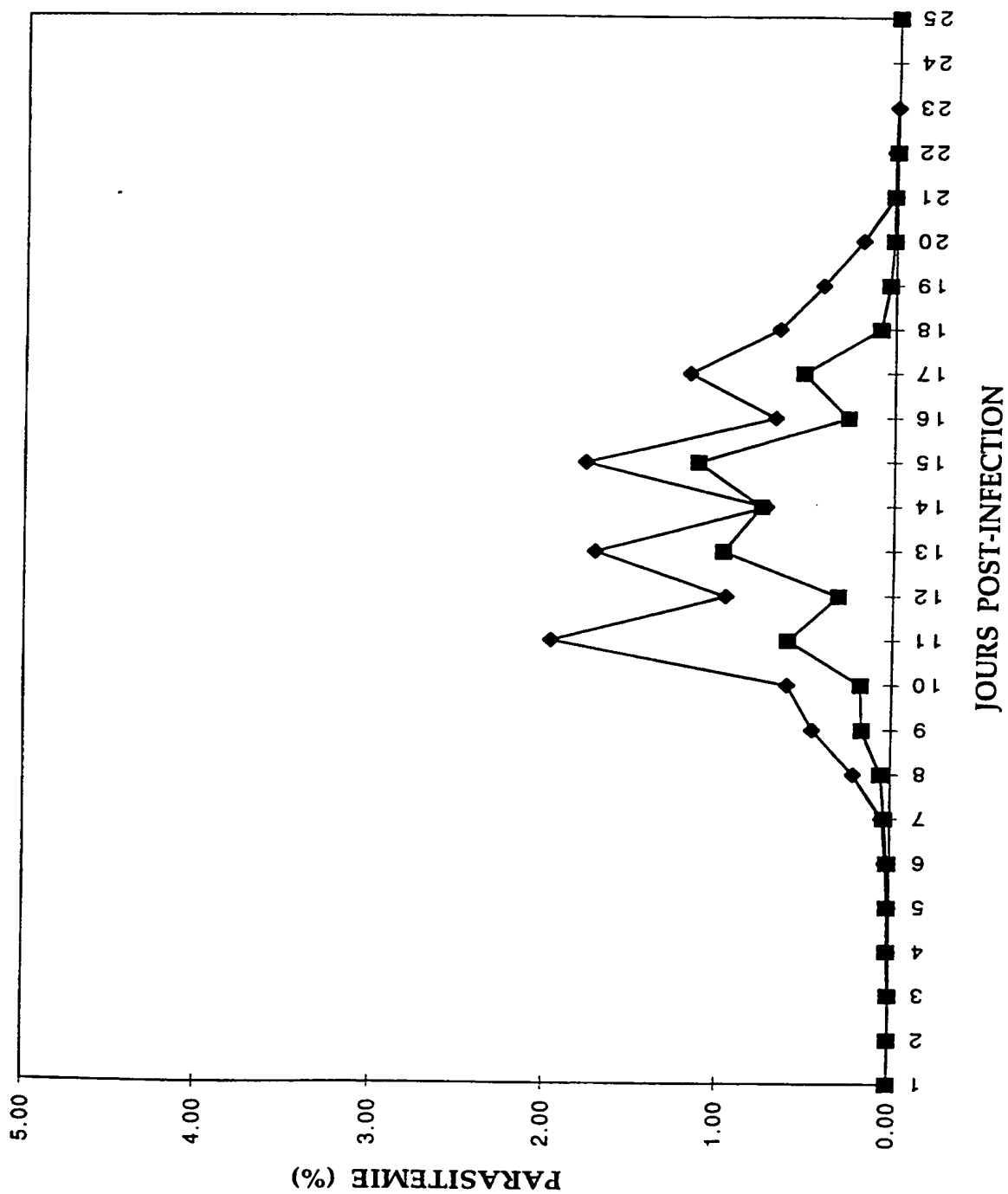
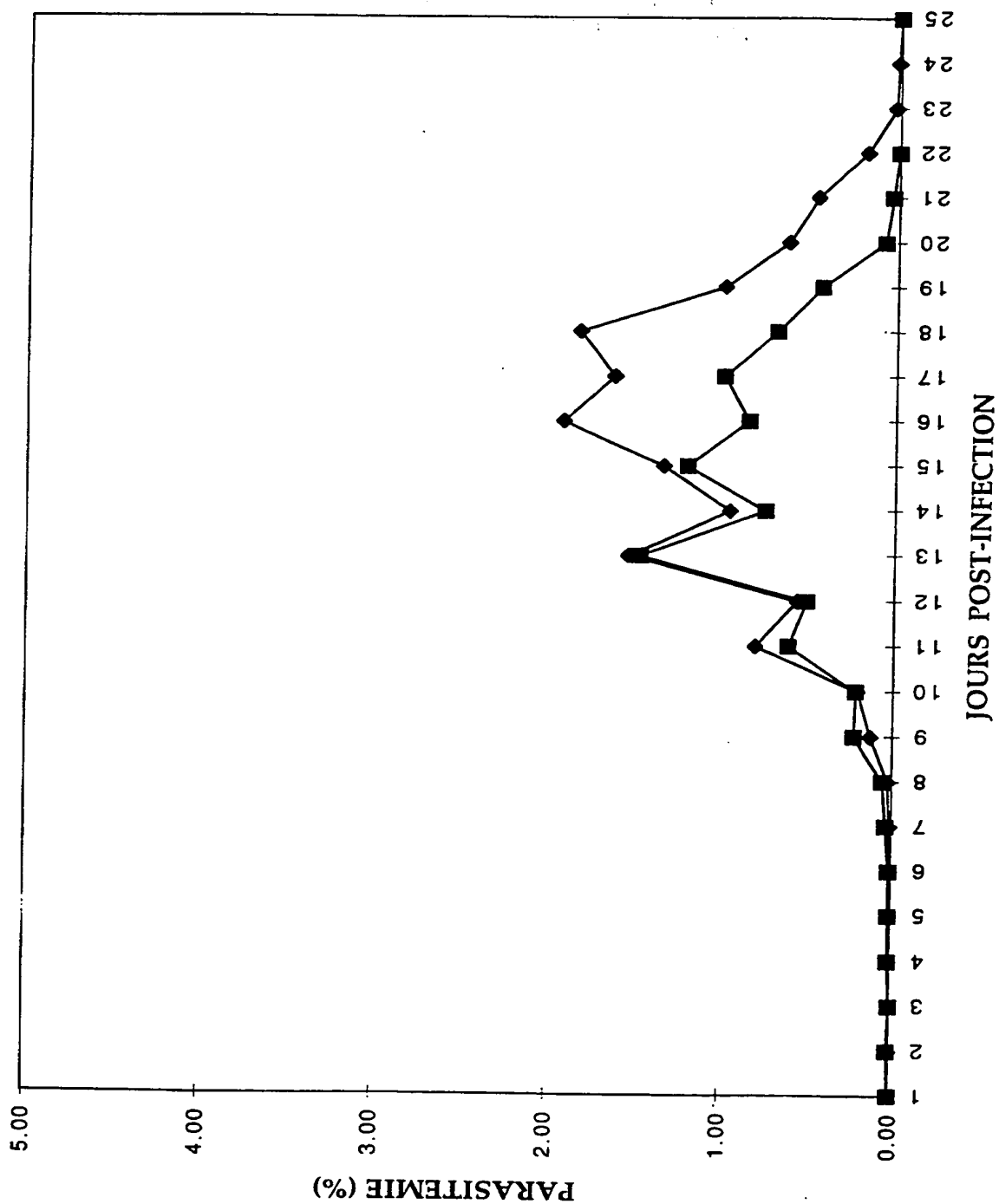


FIGURE 10E

**This Page Blank (uspto)**

ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*

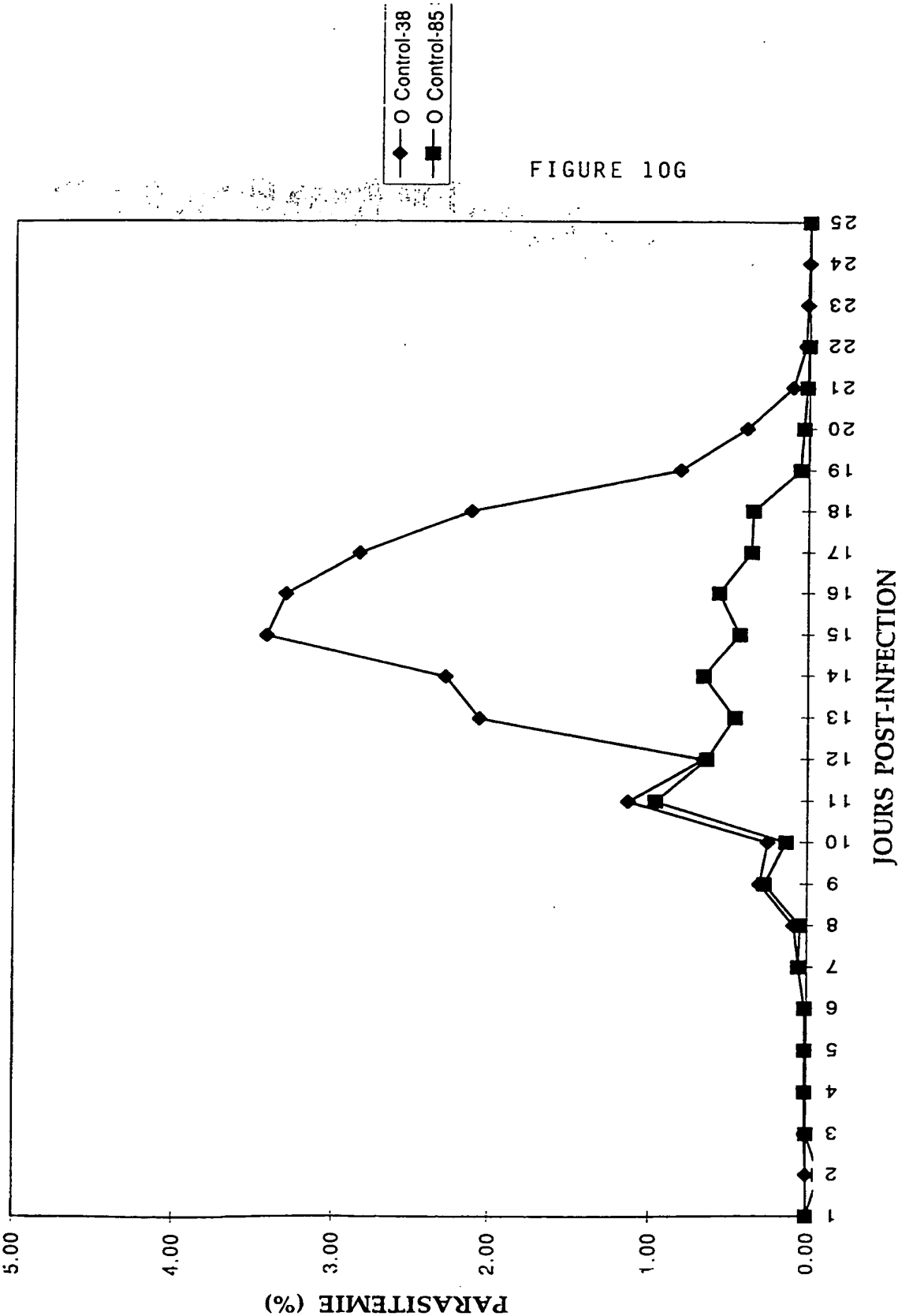
CONTROLE LIPOSOME



This Page Blank (uspto)

ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*

CONTROLE EAU PHYSIOLOGIQUE



This Page Blank (uspto)



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b>  <b>C12N 15/30, 15/86, C07K 14/445, 16/20</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/30158</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 21 août 1997 (21.08.97)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/00290  <b>(22) Date de dépôt international:</b> 14 février 1997 (14.02.97)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/01822 14 février 1996 (14.02.96) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf FR US):</b> NEW YORK UNIVERSITY [US/US]; Medical Center, 550 First Avenue, New-York, NY 10016 (US).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> LONGACRE-ANDRE, Shirley [FR/FR]; 11, rue d'Assas, F-75006 Paris (FR). ROTH, Charles [US/FR]; c/o Agnès Rimond, 18, rue Geneviève-Couturier, F-92500 Rueil-Malmaison (FR). NATO, Faridabano [FR/FR]; 65, rue Mirabeau, F-92160 Antony (FR). BARNWELL, John, W. [US/US]; Apartment 10D, 3 Washington Square Village, New York, NY 10012 (US). MENDIS, Kamini [LK/LK]; Kynsey Road, P.O. Box 271, Columbo 8 (LK).		<b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasserand S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, CN, JP, KP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>  <b>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:</b> 23 octobre 1997 (23.10.97)
<b>(54) Title:</b> RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF PLASMODIUM MSP-1  <b>(54) Titre:</b> PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT C-TERMINAL DE MSP-1 DE PLASMODIUM  <b>(57) Abstract</b>  <p>The invention relates to a recombinant protein fabricated in a baculovirus system, of which the essential constitutive polypeptide sequence is that of a C-terminal fragment of 19 kilodalton (p19) of the surface protein 1 (protein MSP-1) of the merozoite parasite of the <i>Plasmodium</i> type, particularly <i>Plasmodium falciparum</i>, which is infectious for humans, said C-terminal fragment remaining normally anchored at the surface of the parasite at the end of its penetration phase into human erythrocytes, in the occurrence of an infectious cycle. Said recombinant protein is applicable to the production of vaccines against malaria.</p> <b>(57) Abrégé</b>  <p>L'invention concerne une protéine recombinante, fabriquée dans un système à baculovirus, dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type <i>Plasmodium</i>, en particulier <i>Plasmodium falciparum</i>, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux. Cette protéine recombinante est applicable à la production de vaccins contre la malaria.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/00290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/30 C12N15/86 C07K14/445 C07K16/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 74, no. 1, 20 December 1995, pages 105-111, XP000603955 LONGACRE, S.: "The Plasmodium cynomolgi merozoite surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other Plasmodium species" cited in the application	1,13,25, 30,31,42
Y	see page 107, column 1, line 4 - line 9  see page 109, column 1, line 5 - line 11; figures 1,2  --- -/--	2,4-12, 16, 26-29,42

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 1997

Date of mailing of the international search report

16. 09. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00290

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 January 1994, pages 191-205, XP000603954 LONGACRE, S. ET AL.: "Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus" cited in the application	2,4-12, 17, 26-29,42
X	see the whole document	17,20
X	WO 93 17107 A (MEDICAL RES COUNCIL) 2 September 1993	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	see the whole document	1,13, 17-22, 24-42
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 60, no. 2, 1 January 1993, pages 303-310, XP000603763 CHAPPEL, J.A. & HOLDER, A.A.: "Monoclonal antibodies that inhibit Plasmodium falciparum invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1"	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	see the whole document	2,4-13, 16,19, 24-45
X	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 2, 15 July 1992, BALTIMORE US, pages 548-555, XP000605417 CHANG, S.P. ET AL.: "A carboxy-terminal fragment of Plasmodium falciparum gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth" see the whole document	1,2,17, 18,42
Y	EP 0 154 454 A (WELLCOME FOUND) 11 September 1985  see page 2, paragraph 3 - page 13, paragraph 2; claims; example 7	1,2,5,6, 12, 16-22, 24-38, 40-45
	--- -/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/00290

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 2 June 1996, page A1117 XP000604872 ANGOV E ET AL: "CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT PLASMODIUM FALCIPARIUM MSP 1 C-TERMINAL FRAGMENT USING CONFORMATION-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES" see abstract</p> <p>-----</p>	20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/00290

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see annexe
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see annexe

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**1. Claims 1 2 4-16, 18, 26, 42, 43 and partially 17, 19, 25, 27-39:**

Recombinant protein of which the essential constitutive polypeptide sequence is:

- either that of a C-terminal fragment of 19 kilodalton (p19) of the merozoite surface protein 1 (protein MSP-1) of a parasite of the *Plasmodium* type, other than *Plasmodium vivax*, and infectious for mammals, particular humans;
- or of a portion of said fragment since it is also susceptible of inducing an immune response capable of inhibiting a parasitemy *in vivo* due to the corresponding parasite;
- or of a peptide capable of inducing an immunological response of the cellular and/or humoral type equivalent to that which is produced by said fragment p19 or to said fragment portion; baculoviral vector for the expression of this protein, organism transfected by such vector, synthetic DNA containing a sequence coding for said protein and utilization in vaccinating compositions.

**2. Claims 17 and 19, both partially:**

Vaccinating composition against a parasite of the *Plasmodium* type infectious for humans and containing as active principle a recombinant protein of which the essential constitutive polypeptide sequence is:

- either that of a C-terminal fragment of 19 kilodalton (p19) of the merozoite surface protein 1 (protein MSP-1) of a parasite of the *Plasmodium* type, infectious for humans;
  - or of a portion of this fragment since the protein is also susceptible of inducing an immune response capable of inhibiting a parasitemy *in vivo* due to the corresponding parasite;
  - or of a peptide capable of inducing an immunological response of the cellular and/or humoral type equivalent to that produced by the fragment p19 or to said portion of this fragment;
- this recombinant protein further comprising conformational epitopes unstable in a reducing medium; in the case not covered by the subject 1 of a protein unrelated to claims 2 to 13 or 16.

**3. Claims 20-22, 24, 40, 41, 45**

Production of a specific antibody which recognizes selectively the p19 of a protein MSP-1 of the merozoite form of a *Plasmodium* parasite infectious for humans other than *Plasmodium vivax* and which does not recognize *Plasmodium vivax*; utilisation for diagnostic or purification purposes, and hybridome secreting the corresponding monoclonal antibodies.

The complete search report has been established.

**Obscurity:**

In claim 3, the terms "corresponding p42 produced in the same conditions" are vague and leave someone in doubt as to the signification of the technical characteristics to which they refer. Furthermore, the syntax of this claim is equivocal thereby introducing an ambiguity as to the real object of the claim. It would be necessary to reformulate this claim in order to eliminate any uncertainty.

**Incoherences:**

Claim 23 relates to "a monoclonal antibody according to claim 20 characterized in that it recognizes specifically p19 of *P. vivax*." Now then, claim 20 characterizes the antibody concerned by the fact that it "does not recognize *P. vivax*". Consequently, this is consequently incoherent and this claim could not be searched.

Claim 44 relates to "a vaccine composition according to claim 23". Now, claim 23 relates to an antibody. Consequently, the object of the claim is not clearly defined. The search has been carried out while considering that it referred to a vaccine composition according to claim 43.

**Incomplete search:**

Claims for which a complete search has been made:  
Claims for which a complete search has not been made:

1, 2, 4-22, 24-45  
3, 23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/00290

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9317107 A	02-09-93	AU 3570493 A CA 2128109 A JP 0627004 A JP 7504321 T NZ 249208 A	13-09-93 02-09-93 07-12-94 18-05-95 26-03-96
EP 0154454 A	11-09-85	AU 592749 B AU 3904685 A GB 2154592 A IL 74409 A JP 2584733 B JP 61019490 A JP 6189772 A US 5597708 A	25-01-90 05-09-85 11-09-85 26-08-94 26-02-97 28-01-86 12-07-94 28-01-97

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No  
PCT/FR 97/00290

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/30 C12N15/86 C07K14/445 C07K16/20

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 74, no. 1, 20 Décembre 1995, pages 105-111, XP000603955 LONGACRE, S.: "The Plasmodium cynomolgi merozoite surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other Plasmodium species" cité dans la demande	1,13,25, 30,31,42
Y	voir page 107, colonne 1, ligne 4 - ligne 9  voir page 109, colonne 1, ligne 5 - ligne 11; figures 1,2  --- -/--	2,4-12, 16, 26-29,42

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 Août 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.09.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No  
PCT/FR 97/00290

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 Janvier 1994, pages 191-205, XP000603954 LONGACRE, S. ET AL.: "Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus" cité dans la demande	2,4-12, 16, 26-29,42
X	voir le document en entier ---	17,20
X	WO 93 17107 A (MEDICAL RES COUNCIL) 2 Septembre 1993	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	voir le document en entier ---	1,13, 17-22, 24-42
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 60, no. 2, 1 Janvier 1993, pages 303-310, XP000603763 CHAPPEL, J.A. & HOLDER, A.A.: "Monoclonal antibodies that inhibit Plasmodium falciparum invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1"	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	voir le document en entier ---	2,4-13, 16,19, 24-45
X	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 2, 15 Juillet 1992, BALTIMORE US, pages 548-555, XP000605417 CHANG, S.P. ET AL.: "A carboxy-terminal fragment of Plasmodium falciparum gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth" voir le document en entier ---	1,2,17, 18,42
Y	EP 0 154 454 A (WELLCOME FOUND) 11 Septembre 1985  voir page 2, alinéa 3 - page 13, alinéa 2; revendications; exemple 7 ---	1,2,5,6, 12, 16-22, 24-38, 40-45
	---	

-/--



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No  
PCT/FR 97/00290

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	<p>FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 2 Juin 1996, page A1117 XP000604872 ANGOV E ET AL: "CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT PLASMODIUM FALCIPARIUM MSP 1 C-TERMINAL FRAGMENT USING CONFORMATION-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES" voir abrégé</p> <p>-----</p>	20

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°

PCT/FR 97/00290

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir annexe
3. ☐ Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir annexe

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/210

**1. Revendications 1 2 4-16, 18, 26, 42, 43 et partiellement 17, 19, 25, 27-39 :**

Protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

. soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, autre que *Plasmodium vivax*, et infectieux pour des Mammifères, notamment pour l'Homme;

. soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie *in vivo* due au parasite correspondant;

. soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment;

vecteur baculoviral pour l'expression de cette protéine, organisme transfecté par un tel vecteur, ADN synthétique contenant une séquence codant pour cette protéine et utilisation dans des compositions vaccinales.

**2. Revendications 17 et 19, toutes deux partiellement:**

Composition vaccinale contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'Homme contenant à titre de principe actif une protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

. soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme;

. soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie *in vivo* due au parasite correspondant;

. soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment;

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur; dans le cas non couvert par le sujet 1 d'une protéine ne relevant pas des revendications 2 à 13 ou 16.

**3. Revendications 20-22, 24, 40, 41, 45**

Production d'un anticorps spécifique reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaissant pas *Plasmodium vivax*; utilisation à des fins diagnostiques ou de purification, et hybridome sécréteur d'anticorps monoclonaux correspondants.

Le rapport de recherche complète a été établi.

**Obscurité :**

Dans la revendication 3, les termes "p42 correspondante produite dans les mêmes conditions" sont vagues et laissent un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles ils se réfèrent. De plus la syntaxe de cette revendication est équivoque ce qui introduit une ambiguïté quant à l'objet réel de la revendication. Il serait nécessaire de reformuler cette revendication pour éliminer toute incertitude.

**Incohérences:**

La revendication 23 concerne un "anticorps monoclonal selon la revendication 20 caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. vivax*". Or la revendication 20 caractérise l'anticorps concerné par le fait qu'il ne reconnaît pas *P. vivax*". Il y a par conséquent incohérence et cette revendication n'a pu être recherchée.

La revendication 44 concerne une "composition de vaccin selon la revendication 23". Or la revendication 23 se rapporte à un anticorps. Par conséquent l'objet de la revendication n'est pas clairement défini. La recherche a été effectuée en considérant qu'il s'agissait d'une composition de vaccin selon la revendication 43.

**Recherche incomplète :**

Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes :

1, 2, 4-22, 24-45

Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches complètes :

3, 23

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No  
PCT/FR 97/00290

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9317107 A	02-09-93	AU 3570493 A	13-09-93
		CA 2128109 A	02-09-93
		EP 0627004 A	07-12-94
		JP 7504321 T	18-05-95
		NZ 249208 A	26-03-96
-----			
EP 0154454 A	11-09-85	AU 592749 B	25-01-90
		AU 3904685 A	05-09-85
		GB 2154592 A	11-09-85
		IL 74409 A	26-08-94
		JP 2584733 B	26-02-97
		JP 61019490 A	28-01-86
		JP 6189772 A	12-07-94
		US 5597708 A	28-01-97
-----			



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/30, 15/86, C07K 14/445, 16/20</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/30158</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 21 août 1997 (21.08.97)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/00290 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 14 février 1997 (14.02.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/01822 14 février 1996 (14.02.96) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf FR US):</b> NEW YORK UNIVERSITY [US/US]; Medical Center, 550 First Avenue, New-York, NY 10016 (US). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> LONGACRE-ANDRE, Shirley [FR/FR]; 11, rue d'Assas, F-75006 Paris (FR). ROTH, Charles [US/FR]; c/o Agnès Rimond, 18, rue Geneviève-Couturier, F-92500 Rueil-Malmaison (FR). NATO, Faridabano [FR/FR]; 65, rue Mirabeau, F-92160 Antony (FR). BARNWELL, John, W. [US/US]; Apartment 10D, 3 Washington Square Village, New York, NY 10012 (US). MENDIS, Kamini [LK/LK]; Kynsey Road, P.O. Box 271, Columbo 8 (LK).	<b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasserand S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR). <b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, CN, JP, KP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> <b>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:</b> 23 octobre 1997 (23.10.97)	
<b>(54) Title:</b> RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF PLASMODIUM MSP-1 <b>(54) Titre:</b> PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT C-TERMINAL DE MSP-1 DE PLASMODIUM <b>(57) Abstract</b> The invention relates to a recombinant protein fabricated in a baculovirus system, of which the essential constitutive polypeptide sequence is that of a C-terminal fragment of 19 kilodalton (p19) of the surface protein 1 (protein MSP-1) of the merozoite parasite of the <i>Plasmodium</i> type, particularly <i>Plasmodium falciparum</i> , which is infectious for humans, said C-terminal fragment remaining normally anchored at the surface of the parasite at the end of its penetration phase into human erythrocytes, in the occurrence of an infectious cycle. Said recombinant protein is applicable to the production of vaccines against malaria. <b>(57) Abrégé</b> L'invention concerne une protéine recombinante, fabriquée dans un système à baculovirus, dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type <i>Plasmodium</i> , en particulier <i>Plasmodium falciparum</i> , infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux. Cette protéine recombinante est applicable à la production de vaccins contre la malaria.		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT C-TERMINAL DE MSP-1 DE PLASMODIUM

L'invention concerne de nouveaux principes actifs de vaccins dérivés de la protéine majeure de surface de formes mérozoïtes d'un  
10 *Plasmodium* infectieux pour des mammifères, notamment l'homme, plus généralement connue sous la désignation MSP-1.

Cette protéine a déjà fait l'objet d'études nombreuses. Elle est synthétisée dans le stade schizonte des parasites du type *Plasmodium*, notamment *Plasmodium falciparum*, et est exprimée sous forme de l'un des  
15 constituants majeurs de la surface des mérozoïtes aussi bien pendant le stade hépatique que pendant le stade érythrocytaire du paludisme (1, 2, 3, 4). En raison du caractère prédominant et de la conservation dans toutes les espèces de *Plasmodium* connues de cette protéine, il a été suggéré qu'elle pourrait représenter un candidat pour la constitution de vaccins  
20 anti-paludiques (5, 6).

Il en a encore été de même pour des fragments de cette protéine, particulièrement des produits naturels de clivage dont l'on observe la formation, par exemple au cours de l'invasion par le parasite des érythrocytes de l'hôte infecté. Parmi, ces produits de clivage, on relèvera le  
25 fragment C-terminal ayant un poids moléculaire de 42 kDa (7,8) qui est à son tour clivé une nouvelle fois en un fragment N-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 33 kDa et en un fragment C-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 19 kDa (9) qui reste normalement fixé à la membrane du parasite au terme des  
30 modifications dont il est lui-même l'objet, par l'intermédiaire de groupes du type glycosylphosphatidylinositol (GPI) (10, 11).

On le retrouve encore au stade anneau précocé du cycle de développement intraérythrocytaire (15, 16), d'où les observations qui ont été faites que ce fragment de 19 kDa pourrait jouer un rôle non encore connu, mais sans doute essentiel dans les processus réinvasifs. De là  
5 découlent les hypothèses déjà formulées dans le passé que cette protéine pourrait constituer une cible particulièrement efficace pour d'éventuels vaccins.

Il sera entendu que les références souvent faites dans ce qui suit à des protéines p42 et p19 issues d'un certain type de *Plasmodium*  
10 s'entendent comme se rapportant aux produits de clivage C-terminaux correspondants de la protéine MSP-1 de ce *Plasmodium*, ou, par extension, à des produits contenant sensiblement les mêmes séquences en acides aminés, obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique selon les techniques classiques, par exemple par synthétiseur de  
15 type « Applied System » ou par synthèse sur phase solide de type « Merrifield ». Pour la commodité du langage, les références à des « p42 recombinantes » et des « p19 recombinantes » se rapportent à des « p42 » et « p19 » obtenues par des techniques comportant au moins une étape de génie génétique.

20 Devant la difficulté d'obtenir des quantités importantes de parasites pour *P. falciparum* et l'impossibilité de cultiver *P. vivax in vitro*, il est devenu évident que le seul moyen de produire un vaccin antipaludique nécessite un recours aux techniques permettant l'utilisation des peptides ou protéines recombinantes. Mais, le MSP-1 est très difficile à produire en  
25 entier à cause de sa grande taille d'environ 200 kDa, un fait qui a conduit les chercheurs à s'intéresser à la partie C-terminale dont la fonction, encore inconnue, est vraisemblablement la plus importante.

Au titre, des protéines recombinantes concernant la partie C-terminale de MSP-1 de *P. falciparum*, qui ont été produites et testées chez  
30 le singe (12, 40, 41) on mentionnera :



- une p19 fusionnée avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* (40),
- une p42 fusionnée avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* (12),
- 5 • une p19 fusionnée avec un polypeptide issu d'une anatoxine tétanique et porteur d'épitopes de cellules T auxiliaires produites dans *S.cerevisiae* (12),
- une p42 produite dans un système baculovirus (41).

10 Une composition contenant la protéine de fusion p19 avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* en association avec alun ou liposomes n'a pas exercé d'effet protecteur sur aucun des six singes *Aotus nancymai* vaccinés (40).

Une composition contenant la protéine de fusion p42 avec une  
15 glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* en association avec un adjuvant complet de Freund n'ont pas exercé d'effet protecteur dans les deux types de singes *Aotus* (*A.nancymai* et *A.vociferans*) auxquels elles avaient été administrées. La protéine p19 produite dans *S.cerevisiae* a exercé un effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.nancymai*  
20 (12). Par contre elle n'a pas exercé d'effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.vociferans*.

Certains chercheurs (Chang et al.) ont également rapporté des essais d'immunisation réalisés chez le lapin avec une protéine recombinante p42 produite dans un système baculovirus et contenant une  
25 séquence d'acides aminés en commun avec *P.falciparum* (18). Ainsi ces derniers auteurs indiquent-ils que cette p42 recombinante se comporte chez le lapin sensiblement de la même façon que la protéine MSP-1 recombinante entière (gp195). Cette protéine p42 en association avec un adjuvant complet de Freund a fait l'objet d'un essai de vaccination dans un  
30 primate non-humain susceptible à l'infection par *P.falciparum*, *Aotus*, *lemurinus grisemembra* (40). Les résultats montrent que 2 sur 3 animaux

ont été complètement protégés et le troisième, bien que montrant une parasitémie semblable aux contrôles, avait une période latente plus longue. Il est néanmoins hasardeux de conclure au caractère protecteur chez l'homme des anticorps ainsi induits à l'encontre des parasites eux-mêmes. Rappelons en effet qu'il n'existe pas actuellement de modèles expérimentaux très satisfaisants chez le primate pour *P. vivax* et *P. falciparum*. Le modèle *Saimiri*, qui a été développé pour *P. falciparum* et *P. vivax*, et le modèle *Aotus* pour *P. falciparum*, sont des systèmes artificiels, nécessitant l'adaptation de souches de parasite et souvent la splénectomie des animaux pour obtenir des parasitémies significatives. En conséquence, les résultats de vaccination provenant de ces modèles ne peuvent avoir qu'une valeur prédictive limitée pour l'Homme.

On peut de toute façon aussi s'interroger sur ce que serait un taux réel de vaccination susceptible d'être éventuellement obtenu avec de telles protéines recombinantes, compte tenu de la constatation -rapportée plus loin- qui a été faite de la présence dans les p42 issues des *Plasmodiums* de la même espèce, et plus particulièrement dans les p33 correspondantes, de régions hypervariables qui rendraient aléatoires en de nombreux cas l'efficacité immunoprotectrice des anticorps induits chez des personnes vaccinées par une p42 issue d'une souche de *Plasmodium* à l'encontre d'une infection par d'autres souches de la même espèce (13).

On peut même supposer que le polymorphisme important de la partie N-terminale du p42 joue un rôle significatif dans l'échappement immunitaire, souvent observé pour ce type de parasites.

La présente invention a pour objectif la production de protéines recombinantes vaccinales échappant à ces difficultés, dont l'effet protecteur est vérifiable dans des modèles expérimentaux réellement significatifs, ou même directement chez l'homme.

L'invention concerne plus particulièrement des compositions vaccinales contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif une protéine recombinante

glycosylée ou non, dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide immunologiquement équivalent à ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant, de préférence, la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

La présence de ces épitopes conformationnels pourrait jouer un rôle important dans l'efficacité protectrice du principe actif de vaccins. On les retrouve tout particulièrement dans les principes actifs présentant par ailleurs les autres caractéristiques définies ci-dessus, lorsqu'ils ont été produits dans un système vecteur baculovirus. S'il en est besoin, il est mentionné ci-après que par l'expression « système de vecteur baculovirus » on entend l'ensemble que constitue le vecteur type baculovirus lui-même et les lignées cellulaires, notamment cellules d'insectes transfectables par un baculovirus modifié par une séquence à transférer dans ces lignées cellulaires avec pour résultat l'expression de cette séquence transférée. Des exemples préférés de ces deux partenaires du système baculovirus, ont été décrits dans l'article de Longacre et al. (19). C'est le même système qui a été utilisé dans les exemples qui suivent. Il va naturellement de soi que des variants, tant du baculovirus

que des cellules infectables par ce baculovirus peuvent être utilisés en lieu et place de celui qui a été choisi.

En particulier ladite protéine recombinante est reconnue par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant ou contre un *Plasmodium* homologue lorsqu'elle est à l'état non réduit ou dans un état réduit non irréversible, mais non reconnue ou peu reconnue par ces mêmes antisérums, lorsqu'elle est irréversiblement réduite.

Le caractère instable en milieu réducteur de ces épitopes conformationnels peut être mis en évidence, notamment par le test décrit plus loin dans les exemples, notamment en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. De même sont indiquées dans des exemples ci-après des conditions expérimentales applicables à l'obtention d'une réduction irréversible des protéines conformes à l'invention.

De ce point de vue, la protéine recombinante produite par S. Longacre et al. (14) peut être mise en oeuvre dans de tels compositions. Il est rappelé que S. Longacre et al. réussirent à produire une p19 recombinante issue de la MSP-1 de *P. vivax* dans un système vecteur à baculovirus contenant une séquence nucléotidique codant pour la p19 de *Plasmodium vivax*, en particulier par transfection de cultures de cellules d'insectes [lignée de *Spodoptera frugiperda* (SF9)] avec des baculovirus vecteurs contenant, sous le contrôle du promoteur de la polyhédrine, une séquence codant pour les fragments peptidiques définis ci-dessous, dont les séquences étaient placées dans l'ordre suivant dans le vecteur baculovirus utilisé :

- fragment 5'-terminal de 35 paires de bases de la séquence signal de la polyhédrine, dont avait été muté (en ATT) le codon méthionine d'initiation de l'expression de cette protéine;
- un fragment 5'-terminal nucléotidique codant pour un peptide de 32 acides aminés correspondant à la partie N-terminale de MSP-1, y compris le peptide signal de MSP-1 ;

- soit une séquence nucléotidique codant pour la p19, soit une séquence codant pour la p42 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium vivax*, ces séquences étant aussi, selon le cas, soit pourvues (formes « ancrées »), soit dépourvues (formes solubles) des régions d'extrémité 3' de ces séquences de nucléotides dont les produits d'expression C-terminaux extrêmes sont réputés jouer un rôle essentiel dans l'ancrage de la protéine finale p19 sur la membrane du parasite ;
- 2 codons stop TAA.

Pour la p42, les séquences dérivées de la région C-terminale de MSP-1 s'étendaient par conséquent de l'acide aminé Asp 1325 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble) et pour la p19, les séquences s'étendaient de l'acide aminé Ile 1602 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble), étant entendu que les séquences en acides aminés complètes de p42 et p19 dont les acides aminés initiaux et terminaux ont été indiqués dans ce qui précède découlent du gène de l'isolat Belem de *P. vivax* qui a été séquencé (20).

Des résultats semblables ont été obtenus en mettant en oeuvre dans les mêmes systèmes de vecteurs des séquences nucléotidiques codant pour la p42 et la p19 de *Plasmodium cynomolgi*. *P. cynomolgi* présente un double intérêt : c'est une espèce parasitaire très proche de *P. vivax* qui est infectieuse pour le macaque. Il peut aussi infecter l'Homme. On a également accès à des hôtes naturels de *P. cynomolgi*, les singes rhésus et les singes toques, pour tester l'efficacité de protection du MSP-1 de *P. cynomolgi* dans des systèmes naturels. Le singe rhésus est considéré comme une des espèces les plus représentatives des réactions immunitaires chez l'Homme.

En particulier, on a obtenu d'excellents résultats dans des essais de vaccination réalisés chez le singe toque avec deux polypeptides recombinants : la p42 et, surtout, la p19 solubles, dérivées de *P. cynomolgi*, respectivement produites dans un système baculovirus et purifiées sur

colonne d'affinité avec des anticorps monoclonaux reconnaissant les régions correspondantes de la protéine MSP-1 native. Les observations suivantes ont été faites : les six singes immunisés avec le seul p19 (trois singes) et le 19 et p42 ensemble (3 singes) ont tous témoigné d'une  
5 immunité presque stérile après infection d'épreuve. Les résultats obtenus chez les trois singes immunisés avec le p42 ont été moins significatifs. Deux d'entre eux se sont comportés comme les précédents, mais si le troisième a manifesté une parasitémie moins importante que des témoins immunisés avec un tampon PBS en présence de l'adjuvant de Freund (3  
10 singes) ou non immunisés (3 singes), elle n'en n'était pas moins patente.

Une deuxième infection d'épreuve montrant que les singes ayant reçu la p19 seule étaient protégés au moins pendant six mois. Un deuxième essai de vaccination avec la p19 en association avec alun dans ce système (*P.cynomolgi*/singe toque) a démontré une protection  
15 significative pour 2 des 3 singes. C'est la première fois que la MSP-1 ou un autre antigène recombinant a démontré un effet protecteur en présence d'alun (42).

Les résultats des essais particulièrement efficaces réalisés chez le macaque avec des polypeptides recombinants produits dans un système  
20 baculovirus mettant en oeuvre une p19 recombinante de *P.cynomolgi*, établissent que des polypeptides recombinants contenant respectivement des p19 recombinantes issus d'autres *Plasmodiums* doivent se comporter de la même manière. Ils sont « plus parlants » pour le paludisme chez l'Homme que les résultats d'essais réalisés avec *P.vivax* ou *P.falciparum*  
25 dans leurs « hôtes artificiels ».

Les protéines recombinantes de baculovirus, dérivées d'une partie C-terminale de MSP-1 (p19), ont un effet protecteur antipaludique très significatif dans un système naturel, qui constitue le modèle d'évaluation de l'effet protecteur de MSP-1 le plus représentatif pour l'homme.

30 L'effet protecteur obtenu pourrait être d'autant meilleur que la forme p19 est dépourvue de la région hypervariable de la partie N-terminale du

p42, dont l'effet peut être délétère dans des situations naturelles dans lesquelles le sujet vacciné est confronté à un polymorphisme important. Aussi la p19 semble posséder des épitopes spécifiques qui ne sont pas présents dans la p42.

5           Le fragment C-terminal de 19 kDa dont la séquence est présente dans le principe actif du vaccin peut être limité à la séquence de la p19 elle-même, en l'absence de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence de p19 dans la protéine MSP-1 correspondante. Il va néanmoins de soi que la séquence polypeptidique constitutive  
10           essentielle du principe actif peut encore comporter une séquence polypeptidique du côté C-terminal appartenant au fragment N-terminal de 33 kDa (p33) encore associée à la p19 dans la p42 correspondante, avant le clivage naturel de cette dernière, et cela chaque fois que la présence de ce fragment n'est pas de nature à modifier les propriétés immunologiques  
15           du principe actif du vaccin. Comme cela sera vu plus loin, notamment à propos de la description des exemples, les séquences C-terminales de la p33 de souches diverses d'une même espèce de *Plasmodium* (voir la partie C-terminale des séquences peptidiques de la « région III » de la figure 4), présentent aussi encore un degré d'homologie ou de  
20           conservation substantielle de la séquence, par exemple de l'ordre de 80% au moins, dans différentes variétés de *Plasmodiums* infectieux pour l'homme, de sorte qu'elles ne sont pas de nature à modifier fondamentalement les propriétés vaccinales du principe actif (dont la séquence correspond à la région IV) de la figure 4, en particulier dans  
25           l'hypothèse qui découle de cette figure le site de clivage présumé entre la p19 et la région III de la p33 se situe entre les résidus leucine et asparagine dans une région particulièrement bien conservée (LNVQTQ).

          Normalement la séquence polypeptidique C-terminale de la p33, lorsqu'elle est présente, comprend moins de 50 résidus d'acides aminés,  
30           voire même moins de 35, ou même moins de 10 résidus d'acides aminés.

A l'inverse, la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe actif de vaccin peut ne pas comporter la totalité de la séquence codant pour la p19, naturellement sous réserve que cette dernière conserve la capacité d'induire des anticorps protecteurs contre le parasite.

5 En particulier la susdite « partie de fragment a un poids moléculaire de 10 à 25 kDa, notamment de 10 à 15 kDa. De préférence, cette partie de fragment polypeptidique contient au moins l'une des deux régions EGF (abréviation de l'expression anglaise « Epidermal Growth Factor »).

Il est clair que l'homme du métier est à même de faire la différence

10 entre les fragments actifs et ceux qui cesseraient de l'être, notamment de façon expérimentale en produisant des vecteurs modifiés contenant des insérats issus de la p19 de longueurs différentes, respectivement isolés à partir des fragments obtenus à partir de la séquence codante pour la p19, par réaction avec des enzymes de restriction appropriés, ou encore par

15 des enzymes exonucléolytiques qui auraient été maintenus au contact du fragment codant pour la p19 pendant des temps variables ; la capacité des produits d'expression de ces insérats dans des cellules eucaryotes correspondantes, notamment des cellules d'insectes, transformées par les vecteurs modifiés correspondants, à exercer un effet protecteur, pouvant

20 alors être testée, notamment dans les conditions expérimentales qui seront décrites plus loin, à propos des exemples. En particulier, les produits d'expression de ces insérats doivent être aptes à inhiber une parasitémie induite *in vivo* par le parasite correspondant entier.

De même, l'invention inclut toutes compositions vaccinales dans

25 lesquelles la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe actif serait constitué d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par la p19 ou au fragment tel qu'il vient d'être défini, dès lors que l'addition, la délétion ou la substitution dans sa séquence de certains

30 acides aminés par d'autres n'entraîneraient pas une modification importante de la capacité du peptide ainsi modifié -ci-après appelé



« peptide immunologiquement équivalent »- à aussi inhiber la susdite parasitémie.

Le fragment de la p19 peut naturellement aussi être associé que ce soit du côté N-terminal ou du côté C-Terminal ou par l'intermédiaire d'une  
5 liaison peptidique à un autre fragment de protéine plasmodiale ayant un potentiel vaccinant comme par exemple une protéine (« Duffy Binding Protein » de *P. vivax* (29) ou EBA-175 de *P. falciparum* (30) et (31) dont une région est spécifiquement riche en cystéine), sous réserve que ne soit pas altérée, au contraire amplifiée, sa capacité d'inhiber une parasitémie  
10 normalement introduite in vivo par le parasite correspondant.

Le fragment codant pour la p19 ou une partie de celle-ci, peut contenir également, en amont de l'extrémité N-terminale de p19, une séquence peptidique encore différente, par exemple à un fragment C-terminal du peptide signal utilisé, tel que celui de la protéine MSP-1.  
15 Cette séquence comprend de préférence moins de 50 acides aminés, par exemple de 10 à 40 acides aminés.

Ces observations s'étendent de la même façon à des p19 issues d'autres *Plasmodium*, en particulier *P. falciparum*, l'espèce dominante des parasites, responsable d'une des formes les plus graves de paludisme.

20 Mais les techniques rappelées ci-dessus pour la production dans un système de baculovirus d'une p19 recombinante issue de *P. vivax* ou *P. cynomolgi* sont difficilement transposables telles quelles à la production d'une p19 recombinante de *P. falciparum* avec un rendement satisfaisant, ne fût-ce que pour obtenir des quantités appréciables autorisant la  
25 réalisation d'essais d'immunoprotection.

L'invention fournit également un procédé remédiant en grande partie à cette difficulté. Il devient aussi possible d'obtenir des rendements beaucoup plus importants en p19 de *P. falciparum* -et d'autres *Plasmodiums* lorsque l'on rencontre des difficultés semblables- en mettant  
30 en oeuvre une séquence nucléotidique synthétique de substitution à la séquence nucléotidique naturelle codant pour la p19 de *Plasmodium*

*falciparum* dans un vecteur d'expression d'un système baculovirus, cette séquence nucléotidique synthétique codant pour la même p19, mais étant caractérisée par une proportion de nucléotides G et C plus élevée que dans la séquence nucléotidique naturelle.

5 En d'autres termes, l'invention découle de la découverte que l'expression dans un système baculovirus d'une séquence nucléotidique codant pour une p19, était apparemment liée à une compatibilité améliorée des codons successifs de la séquence nucléotidique à exprimer avec la  
10 « machinerie cellulaire » des cellules hôtes transformables par des baculovirus, à l'instar de ce qui est observé pour les séquences nucléotidiques naturelles normalement contenues dans ces baculovirus et exprimées dans les cellules hôtes infectées ; d'où la mauvaise expression, sinon parfois l'absence totale d'expression d'une séquence nucléotidique native de *P.falciparum* ; d'où également une explication possible à  
15 l'expression plus efficace observée de la p19 de *P.vivax* dans un système baculovirus par Longacre et al. (14) et, comme les inventeurs l'ont aussi constaté, de la séquence de *P.cynomolgi* à partir des séquences nucléotidiques p19 natives correspondantes, en raison de leurs teneurs relatives en nucléotides G et C beaucoup plus élevées que celles des  
20 séquences nucléotidiques natives codant pour les p19 de *P.falciparum*.

L'invention concerne donc aussi, plus généralement, un vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des  
25 cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence nucléotidique codant pour un peptide signal exploitable par un système baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence nucléotidique en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et code pour la séquence peptidique :

- 30 • soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux

pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;

- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide immunologiquement équivalent dérivé du susdit fragment peptidique C-terminal (p19) ou de la susdite partie de fragment peptidique par addition, délétion ou substitution d'acides aminés n'entraînant pas une modification importante de la capacité de ce peptide immunologiquement équivalent à induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale semblable à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant le cas échéant une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée. Cette séquence peut être obtenue par construction d'un gène synthétique dans lequel les codons naturels ont été changés par des codons riches en G/C sans que leur traduction soit modifiée (maintien de la séquence peptidique).

En l'occurrence ladite séquence nucléotidique, fournie par un ADN synthétique, peut présenter au moins 10% de codons modifiés par rapport à la séquence du gène ou du cDNA naturel tout en conservant les caractéristiques de la séquence naturelle traduite, c'est-à-dire le maintien de la séquence en amino-acides.

Cela étant, on n'exclut pas que cette teneur en nucléotides G et C pourrait être davantage accrue, dès lors que les modifications qui en résulteraient quant à la séquence en acides aminés du peptide recombinant -ou peptide immunologiquement équivalent-produit n'entraîneraient pas une perte des propriétés immunologiques, voire

protectrices, des protéines recombinantes formées, notamment dans les essais qui seront illustrés plus loin.

Ces observations s'appliquent naturellement à d'autres *Plasmodium* infectieux pour l'homme, en particulier dès lors que des séquences  
5 nucléotidiques natives codant pour les p19 correspondantes, auraient des teneurs en nucléotides T et A difficilement compatibles avec une expression efficace dans un système baculovirus.

La séquence codant pour le signal utilisé peut être celle normalement associée à la séquence native du *Plasmodium* concerné.  
10 Mais elle peut également être issue d'un autre *Plasmodium*, par exemple *P.vivax* ou *P.cynomolgi* ou d'un autre organisme s'il est susceptible d'être reconnu en tant que signal dans un système baculovirus.

La séquence codant pour la p19 ou un fragment de celle-ci au sein du vecteur considéré est, le cas échéant, dépourvue de la séquence  
15 d'ancrage de la protéine native au parasite dont elle est issue, cas dans lequel la protéine exprimée est en général excrétée dans le milieu de culture (forme soluble). Il est d'ailleurs remarquable à cet égard que dans les conditions de l'invention, les formes solubles et ancrées de protéines recombinantes produites, en particulier lorsqu'elles sont issues de  
20 *P.falciparum* ou *P.cynomolgi* ou *P.vivax*, ont tendance à former des oligomères, cette propriété pouvant être à l'origine des immunogénicités accrues des protéines recombinantes formées.

L'invention concerne tout autant les vecteurs dans lesquels la séquence codante contient la séquence d'extrémité 3' terminale codant  
25 pour la séquence d'extrémité C'-terminale hydrophobe de la p19 et qui est normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine native à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée. Cette région d'extrémité 3'-terminale peut d'ailleurs être hétérologue vis-à-vis de la séquence codant pour la partie soluble de p19, par exemple  
30 correspondre à la séquence 3'-terminale issue de *P.vivax* ou d'un autre organisme dès lors qu'elle code pour une séquence d'ancrage de

l'ensemble de la protéine recombinante produite à la membrane de l'hôte cellulaire du système baculovirus mis en oeuvre. A titre d'exemple de telles séquences d'ancrage on cite la GPI de l'antigène CD59 exprimable dans des cellules d'insectes du type *Spodoptera frugiperda* (32) ou la GPI d'une  
5 protéine humaine CD14 (33).

L'invention concerne naturellement aussi les protéines recombinantes, ces protéines comportant des épitopes conformationnels reconnus par des sérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

10 D'une façon générale, l'invention concerne également toute protéine recombinante du type indiqué ci-dessus, dès lors qu'elle comporte des épitopes conformationnels tels que produits dans le système baculovirus, notamment ceux qui se trouvent être instables en milieu réducteur.

L'invention concerne naturellement lesdites protéines  
15 recombinantes, qu'elles soient sous la forme dite soluble ou sous la forme pourvue d'une région d'ancrage, en particulier aux hôtes cellulaires mis en oeuvre dans le système baculovirus.

Entrent également dans le champ de l'invention, les oligomères produits spontanément dans les systèmes baculovirus utilisés ou produits  
20 a posteriori, en ayant recours à des techniques classiques d'oligomérisation de protéines. La technique couramment utilisée met en oeuvre le glutaraldéhyde. Mais tout système classique de pontage entre des fonctions respectivement amine et carboxyle, telles qu'on les retrouvent dans les protéines pourra également être utilisé. A titre  
25 d'exemples, on peut mettre en oeuvre l'une quelconque des techniques décrites dans la demande de brevet européen 0602079.

Par « oligomère » on entend une molécule contenant de 2 à 50 unités monomère, chacune de ces unités monomère contenant la p19 ou un fragment de celle-ci, tel que défini ci-dessus, capable de former un  
30 agrégat. L'invention porte également sur tout produit de conjugaison entre une p19 ou fragment de p19 tel que défini ci-dessus, d'une part, et une

molécule porteuse –par exemple une polylysine-alanine– utilisable pour la production des vaccins, d'autre part, par l'intermédiaire de liaisons covalentes ou non. Les compositions vaccinales les mettant en oeuvre font également partie de l'invention.

5 L'invention concerne également les compositions de vaccins mettant en oeuvre ces protéines recombinantes oligomères ou conjugués, y inclus d'ailleurs les protéines issues de *Plasmodium vivax*, ces observations s'étendant également aux oligomères de ces protéines recombinantes.

Font également partie de l'invention les compositions dans  
10 lesquelles les protéines recombinantes susmentionnées sont associées à un adjuvant, par exemple un alun. Les protéines recombinantes comportant l'extrême région C-terminale permettant leur ancrage à la membrane des cellules dans lesquelles elles sont produites sont avantageusement utilisées en combinaison avec des lipides aptes à former  
15 des liposomes et appropriés à la production de vaccins. Sans qu'il y ait eu lieu de s'y limiter, on peut avoir recours aux lipides décrits à cet effet par exemple dans l'ouvrage intitulé « Les liposomes aspects technologique, biologique et pharmacologique » de J. Delattre et al., édition INSERM, 1993.

20 La présence de la région d'ancrage dans la protéine recombinante, qu'il s'agisse d'une région d'ancrage homologue ou hétérologue vis-à-vis de la partie vaccinale proprement dite, est de nature à favoriser la production d'anticorps cytophiles, notamment du type IgG<sub>2a</sub> et IgG<sub>2b</sub> chez la souris qui pourraient avoir une activité protectrice particulièrement élevée,  
25 au point que l'on pourrait se dispenser d'associer les principes actifs de vaccins ainsi constitués avec des adjuvants autres que les lipides utilisés pour la constitution des formes liposomiques. Il s'agirait là d'un avantage important, puisque les liposomes peuvent être lyophilisés dans des conditions permettant leur stockage et leur transport, sans que des  
30 chaînes de froid ne soient alors indispensables.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'exemples de protéines recombinantes entrant dans le cadre de l'invention et des conditions dans lesquelles elles peuvent être produites, sans que ces exemples soient de nature à limiter la portée de l'invention.

**Description de la construction PfMSP1<sub>p19</sub>S (soluble) (p19 soluble issue de *P.falciparum*)**

La construction recombinante PfMSP1<sub>p19</sub>S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de base de la séquence leader et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met<sub>1</sub> à Asp<sub>32</sub> (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par le gène synthétique, décrit dans Figure 1, codant le *Plasmodium falciparum* MSP1<sub>p19</sub> de Asn<sub>1613</sub> à Ser<sub>1705</sub> (isolat Uganda-Palo Alto ; Chang et al. 1988. Exp. Parasitol. 67,1). La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules infectées.

De la même façon et à des fins de comparaisons, on a produit une construction recombinante dans des conditions semblables à celles utilisées pour la production de la p19 ci-dessus, mais en travaillant avec une séquence codante consistant en une copie directe de l'ADN correspondant de la souche *P.falciparum* (FUP) décrite par Chang et al., Exp. Parasit. 67,1; 1989. La copie de ce gène naturel (s'étendant de l'asparagine 1613 à la sérine 1705) a été formée par PCR à partir du gène natif.

On a représenté dans la Figure 1A les séquences à la fois du gène synthétique (Bac19) et du « gène natif » (PF19).

On remarque que 57 codons sur les 93 codons de la séquence codante native pour la p19 issue de *P.falciparum* ont été modifiés (pour ce qui est du troisième nucléotide dans 55 d'entre eux et du premier et troisième nucléotides dans les deux codons restant). Des codons nouveaux ont été ajoutés à l'extrémité 5' pour introduire le peptide signal dans les conditions qui ont été indiquées ci-dessus et pour introduire un site EcoRI pour le clonage, d'une part, et de même ont été ajoutés deux codons stop non présents dans la p19 de *P.falciparum* aux fins d'obtenir des signaux de terminaison de l'expression. Les lettres individualisées placées respectivement au dessus des codons successifs correspondent aux acides aminés respectifs successifs. Les astérisques (\*) se rapportent aux codons stop. Les lignes verticales soulignent les nucléotides qui sont les mêmes dans les deux séquences.

**Description de la construction PfMSP1<sub>p19</sub>A (ancré GPI) (p19 ancrée de *P.falciparum*)**

La construction PfMSP1<sub>p19</sub>A a des caractéristiques de la précédente sauf que la séquence synthétique (**Figure 1B**) code pour le MSP1<sub>p19</sub> de *Plasmodium falciparum* (isolat Uganda-Palo alto) de Asn<sub>1613</sub> à Ile<sub>1726</sub> suivie par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est ancrée dans la membrane plasmique des cellules infectées par une structure du type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI).

La **figure 1C** est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1<sub>p19</sub>S avant coupure de la séquence signal.

La **figure 1D** est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1<sub>p19</sub>S après coupure de la séquence signal.



Les acides aminés soulignés dans les figures 1C et 1D proviennent du site EcoR1 utilisé pour joindre les séquences nucléotidiques dérivées de la partie N-terminale de MSP1 de *P.vivax* (avec séquence signal) et de MSP1<sub>p19</sub> de *P.falciparum*.

5        **Figure 2** - L'antigène recombinant PfMSP1<sub>p19</sub> soluble purifié par immunoaffinité a été analysé par immunoblot après SDS-PAGE en présence (réduit) ou absence (non réduit) de B-mercaptoéthanol. Les échantillons sont chargés sur gel après chauffage à 95°C en présence de 2% SDS. Dans ces conditions seulement des liaisons du type covalent  
10 (ponts disulfure) peuvent résister à la désagrégation. Le blot de gauche a été révélé avec un anticorps monoclonal qui réagit avec un épitope linéaire de la p19 naturelle. Le blot de droite a été révélé avec un mélange de 13 antisera humains provenant des sujets avec une immunité acquise au paludisme dû à *Plasmodium falciparum*. Ces résultats montrent que la  
15 molécule recombinante de baculovirus reproduit bien les épitopes conformationnels en forme de polymère qui sont reconnus en majorité par l'antiserum humain.

**Figure 2B:** Analyse par immunoblot avec antiserum humain du  
20 MSP-1 p19 purifié de *P. vivax* et *P. cynomolgi* recombinant dans des conditions non-réduites (NR), réduite seulement dans le milieu de chargement (R) et réduite irréversiblement (IR):

Ce travail est basé sur l'idée que le système d'expression baculovirus reproduit correctement et en grande proportion les épitopes  
25 conformationnels présents *in vivo* sur la partie C-terminale de MSP-1. Le meilleur moyen de mesurer cette propriété (et peut être le seul moyen possible en absence des protéines natives purifiées correspondant au p19) est d'étudier la réactivité des protéines recombinantes avec l'antiserum des individus exposés au paludisme, ceci étant un reflet des  
30 protéines natives telles qu'elles sont "vues" par le système immunitaire humain.

Donc, les antigènes recombinants PvMSP-1 p19 et Pc MSP-1 p19 solubles purifiés par immunoaffinité ont été analysés par immunoblot après SDS-PAGE (15%) en présence (réduit) ou absence (non-réduit) de DTT. Les échantillons sont chargés sur gel après chauffage à 95°C en présence de 2% SDS. La réduction irréversible était faite comme suit: la protéine est resuspendue en 0.2 M Tris-HCl, pH 8.4, 100 mM DTT, 1.0% SDS et chauffée 30 minutes à 70°C. Après dilution avec l'eau, de l'acrylamide est ajoutée à une concentration finale de 2 M et la mixture est incubée sous azote sans lumière 1 heure à 37°C. L'immunoblot a été révélé avec un mélange de 25 antisera humains provenant des sujets avec une immunité acquise au paludisme dû à *Plasmodium vivax*. V et C désignent respectivement les protéines dérivées de MSP-1 de *P. vivax* et *P. cynomolgi*. Il est remarquable que les protéines recombinantes réduites de façon irréversible ne montrent aucune réactivité avec l'antisérum humain tandis que les protéines réduites de façon non-irréversible ou non-réduites montrent une bonne réactivité. (Le Pv MSP-1 p19 non-réduit est un peu faible parce que dans son état glycosylé il ne se lie pas très bien au papier nitrocellulose.) Ces résultats montrent que la reconnaissance des molécules MSP-1 p19 de baculovirus par l'antisérum humain est en grande partie, sinon complètement dépendante des épitopes conformationnels sensibles à la réduction qui sont reproduits dans ce système.

**Figure 3** - L'antigène recombinant PvMSP1<sub>p42</sub> soluble (Longacre et al. 1994, op.cit.) a été incubé pendant 5 heures à 37° en présence des fractions de protéines dérivées des mérozoïtes de *P. falciparum* et séparées par isoélectrofocalisation. Par la suite les échantillons ont été analysés par immunoblot en présence (réduit) ou absence (non réduit) de B-mercaptoéthanol. Les fractions 5 à 12 d'isoélectrofocalisation, ainsi que deux extraits totaux de mérozoïtes faits en présence (Tex) ou absence (T) de détergent ont été analysés. L'immunoblot a été révélé avec des anticorps monoclonaux spécifiques pour le MSP1<sub>p42</sub> et p19 de *P. vivax*. Les

résultats suggèrent qu'il y a une activité protéolytique dans les mérozoïtes de *P. falciparum* qui peut être extraite en détergent. La digestion du p42 dans certaines fractions semble provoquer une polymérisation des produits de digestion (p19) ; cette polymérisation est probablement liée à la formation de ponts disulfure puisqu'en présence de B-mercaptoéthanol, les formes de haut poids moléculaire disparaissent en faveur d'une molécule d'environ 19 kDa (Tex-R). La polymérisation du p19 observée dans ces expériences pourrait donc être une propriété intrinsèque de cette molécule *in vivo*.

10

**Figure 3B:** La contribution différentielle des antigènes p42 et p19 à la réponse humaine anti-MSP-1 de *P. vivax*.

La reconnaissance des antigènes MSP-1 p42 et p19 de *P. vivax* par l'antisérum des individus ayant une immunité acquise à *P. vivax* a été comparée par la technique d'inhibition d'ELISA comme suit: un mélange de 25 antisérums humains provenant des sujets avec une immunité acquise au paludisme dû à *P. vivax* a été dilué au 1:5000 et incubé 4 heures à température ambiante soit seul, soit en présence d'une solution de 1 mM p42 ou p19 recombinant purifié de *P. vivax*. Cette mixture a été transférée dans un puits de microtitre auparavant revêtu pendant 18 heures à 4°C par 500 ng ml<sup>-1</sup> p42 ou p19 recombinant purifié absorbé, et incubée 30 minutes à température ambiante. Après lavage avec PBS contenant 0.1% Tween 20, un anti-souris IgG de chèvre conjugué avec peroxydase a été ajouté et la mixture a été incubée 1 heure à 37°C et l'activité enzymatique a été révélée par lecture de la densité optique à 492 nm. La pourcentage d'inhibition a été calculée basé sur des valeurs de 100% de réactivité d'antisérum avec l'antigène revêtu en plaque de microtitre en absence d'un antigène compétiteur. Les données statistiques ont été calculées en utilisant le programme Statview. Chaque barre représente l'inhibition moyenne en pourcentage d'une paire d'antigènes compétiteur / absorbé basée sur 4 à 12 déterminations et les lignes

30

verticales correspondent à un intervalle de 95% de confiance. Les étoiles (\*) désignent des antigènes produits en présence de tunicamycine, donc sans N-glycosylation. Les paramètres importants de ces mesures sont la dilution d'antisérum à 1:5000 qui est dans la région sensible des courbes d'ELISA et les concentrations d'antigènes compétiteurs à 1 mM qui incluent la compétition par les épitopes de basse affinité. Donc, les données reflètent la similitude maximum entre les deux antigènes comparés. Les résultats montrent que la plupart, si ce n'est pas tous les épitopes du p42 reconnus par l'antisérum humain sont présents sur le p19 puisqu'en présence de ce dernier, la réactivité de l'antisérum humain contre le p42 est inhibée autant que par l'antigène p42 lui même. Mais, au contraire, environ 20% des épitopes du p19 reconnus par l'antisérum humain ne le sont pas ou ne sont pas accessibles sur le p42, puisque la réactivité de l'antisérum humain contre le p19 est bien moins inhibée par le p42 que par le p19 lui même. Des tels épitopes spécifiques du p19 peuvent être constitué ou révélés seulement après la coupure du p42 en p19 et p33. Ces résultats ne sont pas affectés par la glycosylation montrant que l'effet est bien dû à une différence entre les composants peptidiques du p19 et p42 et pas à une différence de glycosylation. Ces résultats soulignent le fait que le p19 a une identité immunologique distincte du p42.

#### **Description de la construction PcMSP<sub>1p19</sub>S (soluble) (p19 soluble de *P.cynomolgi*)**

L'ADN utilisé pour la construction susdite a été obtenu à partir d'un clone de la souche de *Plasmodium cynomolgi ceylonesis* (22-23). Cette souche a été maintenue par des passages successifs dans son hôte naturel (*Macaca sinica*) et des transmissions cycliques par l'intermédiaire de moustiques (27).

Des parasites sanguins ont été obtenus à partir des singes infectés au stade schizonte mature quand les parasitémies ont atteint un niveau de

5%. Ils ont alors été purifiés selon la méthodes décrites dans (25). L'ADN a ensuite été extrait comme décrit dans (26).

Un fragment de 1200 paires de base a ensuite été produit en ayant recours à la réaction PCR mettant en oeuvre les oligonucléotides soulignés dans la **Figure 4** et issus de *P.vivax*. L'oligonucléotide 5' comprenait un site de restriction EcoRI et l'oligonucléotide 3' deux codons synthétiques stop TAA suivis d'un site de restriction BglII. Ce fragment a été introduit par ligation et par l'intermédiaire de ces sites EcoRI et BglII dans le plasmide pVLSV<sub>200</sub> contenant déjà la séquence signal de la protéine MSP-1 de *P.vivax* (19). Le nouveau plasmide (pVLSV<sub>200</sub>C<sub>42</sub>) a été utilisé pour l'analyse de séquences d'ADN.

Les séquences de *P.cynomolgi* et des séquences correspondantes de *P.vivax* ont été mises en alignement. Les flèches noires désignent les sites de clivage primaire et secondaire présumés. Ils ont été déterminés par analogie avec les sites connus dans *P.falciparum* (27, 28). Des lignes verticales et des flèches horizontales localisent les limites des quatre régions qui ont été étudiées. La région 4 correspond à la séquence codant pour la p19 de *P.cynomolgi*. Des sites de glycosylation sont encadrés et les cystéines conservées sont soulignées. Dans la partie inférieure de la **Figure 4** sont indiqués les pourcentages identité entre les deux isolats de *P.vivax* et *P.cynomolgi*.

La construction recombinante PcMSP1<sub>p19</sub>S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de bases de la séquence « leader » et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met<sub>1</sub> à Asp<sub>32</sub> (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par la séquence codant pour le MSP1<sub>p19</sub> de *Plasmodium cynomolgi* (souche Ceylon) de Lys<sub>276</sub> à Ser<sub>380</sub>. La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules infectées.

**Purification de la protéine recombinante PfMSP1p19 par chromatographie d'immunoaffinité avec un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement la p19 de *Plasmodium falciparum*.**

La résine de chromatographie a été préparée en liant 70 mg d'un anticorps monoclonal (obtenu à partir d'un hybridome G17.12 déposé à la CNCM (Paris, France) le 14 février 1997 sous le n°I-1846 ; cet hybridome G17.12 a été construit à partir du myélome X63 Ag8 653 produisant des IgG 2a/k reconnaissant la p19 de *P. falciparum*) à 3g de CNBr-Sepharose 4B activé (Pharmacia) par des méthodes standards détaillées dans le mode d'emploi fourni par Pharmacia. Les surnageants de culture contenant le PfMSP1p19 soluble ont été incubés en batch avec la résine de chromatographie pendant 16 heures à 4°C. La colonne a été lavée une fois avec 20 volumes de 0.05% NP40, 0.5M NaCl, PBS ; une fois avec 5 volumes de PBS et une fois avec 2 volumes de 10 mM phosphate de sodium, pH 6.8. L'élution a été effectuée avec 30 ml de 0.2 M glycine, pH 2.2. L'éluat a été neutralisé avec 1 M phosphate de sodium, pH 7.7 puis concentré par ultrafiltration et dialysé contre du PBS. Pour la purification du PfMSP1p19 ancré, toutes les solutions de lavage et élution contenaient en supplément 0.1% 3-(Diméthyl-dodécylammonio)-propane sulfonate (Fluka).

**Essai de vaccination de MSP1 recombinant de *Plasmodium vivax* (p42 et p19) chez le singe écureuil *Saimiri sciureus*.**

Cet essai de vaccination a été fait chez des *Saimiri sciureus boliviensis* mâles de 2 à 3 ans, non splénectomisés. Trois singes ont été injectés 3 fois par voie intramusculaire à 3 semaines d'intervalle avec un mélange d'environ 50 à 100 µg chacun, de PvMSP1<sub>p42</sub> et p<sub>19</sub> soluble recombinant (19), purifié par immunoaffinité. L'adjuvant de Freund complet et incomplet était utilisé comme suit : 1<sup>ère</sup> injection : 1:1 FCA/FIA ; 2<sup>ème</sup> injection 1:4 FCA/FIA ; 3<sup>ème</sup> injection : FIA. Ces compositions d'adjuvant

étaient mélangées par la suite 1:1 avec l'antigène en PBS. Les cinq singes contrôles recevaient l'antigène glutathione-S-transferase (GST) produit dans *E.coli* selon le même protocole. L'infection d'épreuve était effectuée en injectant  $2.10^6$  hématies infectées avec une souche adaptée de *Plasmodium vivax* (Belem) 2.5 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux par examen des frottis colorés avec giemsa.

Les courbes de la **Figure 5** sont représentatives de la variation de la parasitémie mesurée en nombre d'hématies parasitées par microlitre de sang (sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) en fonction du temps écoulé après l'infection (en jours). La courbe A correspond aux valeurs moyennes observées chez les trois singes vaccinés, la courbe B ; les valeurs moyennes chez cinq singes témoins.

De l'examen de la figure découle une très forte réduction de la parasitémie sous l'effet de la vaccination.

#### **Essai de vaccination de MSP1 recombinant de *Plasmodium cynomolgi* (p42 et p19) chez le singe toque, *Macaca sinica*.**

Quinze singes capturés ont été utilisés comme suit : (1) 3 animaux injectés avec 100 µg PcMSP1<sub>p42</sub> soluble ; 3 animaux injectés avec 35 µg (1<sup>ère</sup> injection) ou 50 µg (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> injections) PcMSP1<sub>p19</sub> soluble ; (3) 3 animaux injectés avec un mélange de PcMSP1<sub>p42</sub> et p19 ; (4) 3 animaux injectés avec l'adjuvant plus PBS ; (5) 3 animaux non injectés. L'adjuvant de Freund complet et incomplet a été utilisé selon le protocole décrit ci-dessus. Les injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant  $2.10^5$  hématies infectées avec *Plasmodium cynomolgi* 4 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux en examinant les parasitémies avec giemsa. Les parasitémies ont été classées comme négatives uniquement

après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémiés sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées.

Les **Figures 6A-6G** sont illustratives des résultats obtenus. Dans chacune d'elles apparaissent les parasitémiés (exprimées en pourcentages d'hématies parasitées sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) observées chez les animaux d'épreuve en fonction des temps après l'infection (en jours sur les axes des abscisses).

Les résultats concernent :

- dans la **figure 6A** ; des animaux contrôles non vaccinés ;
- 10 ◦ la **figure 6B** concerne des animaux qui avaient reçu une solution saline contenant en outre l'adjuvant de Freund ;
- la **figure 6C** est une superposition des figures 6A et 6B, dans le but de faire apparaître les résultats relatifs résultant de l'administration de l'adjuvant de Freund aux animaux (les variations ne sont évidemment pas significatives) ;
- 15 ◦ la **figure 6D** fournit les résultats obtenus à l'issue d'une vaccination avec la p42 ;
- la **figure 6E** concerne des animaux vaccinés avec la seule p19 ;
- enfin, la **figure 6F** concerne les animaux vaccinés avec un mélange de p19 et p42.
- 20

La p42 induit certes un certain niveau de protection. Mais comme en témoignent les figures 6E et 6F, la protection conférée par la p19 recombinante selon l'invention est considérablement améliorée.

On peut formuler l'hypothèse que l'amélioration de la protection résulte d'un clivage secondaire de la p42 qui s'accompagne du dévoilement de cystéine libre qui forme, par la suite, des ponts disulfure intermoléculaires donnant lieu à des multimères du p19 très caractéristiques de cette forme dans les protéines recombinantes des trois espèces testées.



Les chiffres utilisés pour élaborer les graphiques (6A-6F) sont précisés dans la **Figure 6G**.

5      **Essai de vaccination *P.cynomolgi* singe toque ; deuxième infection d'épreuve sur singes vaccinés avec p19 seule et contrôles (Figures 8)**

Six mois plus tard, sans autre immunisation, les 3 singes ayant reçu le MSP-1 p19 seule avec FCA/FIA (Figure 6E) et les 3 singes ayant reçu une solution saline contenant l'adjuvant de Freund (Figure 6B) ainsi que 2 nouveaux singes naïfs non vaccinés ont subi une nouvelle infection  
10 d'épreuve par injection de  $1.10^6$  hématies infectées avec *Plasmodium cynomolgi*. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémi-  
journalières chez tous les animaux en examinant les frottis avec du giemsa. Les parasitémi-  
es ont été classées comme négatives uniquement après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémi-  
es sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées (les chiffres utilisés pour  
15 élaborer les graphiques 8A-C sont précisés dans la **Figure 8D**). Les six animaux immunisés qui avaient subi une infection d'épreuve six mois auparavant n'avaient pas de parasitémie détectable sauf pour 1 animal dans chaque groupe qui a présenté une parasitémie à 0.008% pendant 1  
20 jour (**Figures 8A et 8B**). Les deux contrôles naïfs montrent une parasitémie classique avec un maximum de 0.8% et pendant 21 jours (**Figure 8C**). Donc, les 3 animaux vaccinés avec le MSP-1 p19 étaient aussi protégés six mois plus tard que les 3 contrôles qui présentaient une infection complète classique après la première infection d'épreuve, malgré  
25 une absence ou un très faible parasitémie après la première infection d'épreuve. Ces résultats suggèrent que la durée de protection du p19 est au moins de six mois.

### Essai de vaccination avec p19 en association avec alun dans le système *P.cynomolgi*/singes toques (Figures 9)

Les résultats positifs de protection précédents ont été obtenus en utilisant l'adjuvant complet (FCA) ou incomplet (FIA) de Freund. Cependant, le seul adjuvant admis actuellement chez l'homme est l'alun. Pour cette raison, nous avons fait un essai de vaccination avec le MSP-1 p19 de *P. cynomolgi* chez le singe toque en présence d'alun comme adjuvant. Six singes capturés ont été utilisés comme suit: (1) 3 animaux injectés avec 4 doses de 50 mg MSP-1 p19 recombinant de *P. cynomolgi* avec 20 mg d'alun (2) 3 animaux injectés 4 fois avec de l'eau physiologique et 10 mg de alun. Les injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant  $2 \cdot 10^5$  hématies infectées avec *P. cynomolgi* 4 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémiés journalières chez tous les animaux en examinant les frottis avec le giemsa. Les parasitémiés ont été classées comme négatives uniquement après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémiés sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées. Les résultats de cette expérience sont les suivants: 2 des 3 singes immunisés avec le p19 recombinant en alun avaient environ 30 fois moins de parasitémie totale pendant la durée de l'infection (**Figures 9A et 9B**) que les 3 singes contrôles immunisés avec de l'eau physiologique et de l'alun (**Figure 9D**) après l'infection d'épreuve. Le troisième singe immunisé avec p19 (**Figure 9C**) n'était pas très différent des contrôles. Pour l'essai de vaccination de *Plasmodium cynomolgi* p19 chez le singe toque, *Macaca sinica*, décrit dans la Figure 9, les chiffres utilisés pour élaborer les graphiques (9A-9D) sont précisés (**Figure 9E**). Bien que ces résultats soient un peu moins spectaculaires que les précédents (Figures 6, 8); c'est la première fois qu'une protection significative est observée pour MSP-1 recombinante en alun.

**Figure 10** : Essai de vaccination avec une p19 recombinante de *Plasmodium falciparum* chez le singe écureuil.

Vingt singes *Saimiri sciureus guyanensis* (singe écureuil) d'environ 3 ans élevés en captivité ont été utilisés comme suit: (1) 4 animaux injectés avec 50 mg de Pf MSP-1 p19 soluble en présence d'adjuvant de Freund comme suit: 1<sup>ère</sup> injection: 1:1 FCA/FIA; 2<sup>ème</sup> injection: 1:4 FCA/FIA; 3<sup>ème</sup> injection: FIA. Ces compositions d'adjuvant ont ensuite été mélangées avec l'antigène en PBS 1:1; (2) 2 animaux contrôles recevaient l'adjuvant de Freund comme décrit pour (1) avec uniquement PBS; (3) 4 animaux injectés avec 50 mg de Pf MSP-1 p19 soluble en présence de 10 mg d'alun (Alu-Gel-S, Serva); (4) 2 animaux contrôles recevaient 10 mg d'alun avec uniquement PBS; (5) 4 animaux injectés avec environ 50-100 mg Pf MSP-1 p19 ancré GPI reconstitués en liposomes comme suit: 300 mmoles de cholestérol et 300 mmoles de phosphatidyl choline étaient séchés sous vide et resuspendus en 330 mM N-octylglucoside en PBS avec 1.4 mg de Pf MSP-1 p19,GPI. Cette solution avait été dialysée contre PBS avec des Bio-Beads SM-2 adsorbant (Bio-Rad) et les liposomes ainsi formés étaient concentrés par centrifugation et resuspendus en PBS. La 1<sup>ère</sup> injection était faite avec des liposomes frais maintenus à 4°C et les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> injections étaient faites avec des liposomes ayant été congelés pour conservation; (6) 2 animaux injectés avec des liposomes contrôles faits de la même façon en absence de l'antigène p19, GPI, comme décrit pour (5); (7) 2 animaux injectés avec de l'eau physiologique. Trois injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant  $1.10^6$  hématies infectées avec *Plasmodium falciparum*. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux en examinant les frottis avec giemsa. Les parasitémies sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées. Les

résultats de cet essai de vaccination sont exposés dans les **Figures 10, A-G**.

Les groupes immunisés avec le p19 en adjuvant de Freund ou en liposome ont démontré des parasitémies semblables aux groupes  
5 contrôles après une infection d'épreuve (un animal (numéro 29) vacciné avec p19 en adjuvant de Freund est mort quelques jours après l'infection d'épreuve pour des raisons indépendantes de la vaccination (crise cardiaque)). Des irrégularités dans l'administration de l'antigène dans ces  
10 2 groupes (mauvaise émulsion de Freund, liposomes congelés) ne permettent pas d'évaluer de façon complète la signification de ces résultats. Dans le groupe alun 2 animaux ont montré des parasitémies  
totales pendant la durée de l'infection environ 4 fois moins importantes que les contrôles, 1 animal environ 3 fois moins importante et 1 animal était  
15 semblable aux contrôles. Cette expérience est un peu difficile à interpréter à cause de la variabilité dans les contrôles, probablement due à la souche de parasite utilisée pour l'infection d'épreuve qui n'aurait pas été assez  
adaptée au modèle *Saimiri* non spénectomisé mis au point que récemment à Cayenne. Néanmoins, l'effet réel, quoiqu'imparfait, avec l'alun est  
20 encourageant dans la mesure où nos antigènes semblent être les seules versions recombinantes MSP-1 de *P. falciparum* qui, pour l'instant, ont démontré une certaine efficacité en association avec l'alun.

**Essai de vaccination avec une p19 recombinante de *Plasmodium falciparum* chez le singe écureuil** (même essai que Figures 10)

25 Des singes élevés en captivité ont été injectés avec 1 ml d'inoculum par voie intramusculaire 2 fois à 4 semaines d'intervalle comme suit : **(1)** 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en présence d'adjuvant de Freund comme suit: 1ère injection 1:1 FCA/FIA; 2ème injection 1:4 FCA/FIA; et mélangés par la suite 1:1 avec l'antigène en  
30 PBS; **(2)** 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en

présence de 10 mg d'alun; (3) 4 animaux injectés avec environ 50 µg de PfMSP1p19 ancré GPI reconstitués en liposomes composés 1:1 en molarité de cholestérol et phosphatidyl choline. Les animaux ont été saignés 17 jours après la deuxième injection.

5 Les globules rouges provenant d'un singe écureuil avec 30% de parasitémie due à *P. falciparum* (avec des formes mûres en majorité) ont été lavés en PBS et le culot était dilué 8 fois en présence de 2% SDS et 2% dithiothreitol et chauffé à 95° avant d'être chargé sur un gel de polyacrylamide de 7.5% (gel de séparation) et 4% (gel de stacking) (haut  
10 du gel). Après transfère en nitrocellulose l'analyse par immunoblot (immunoempreinte) a été fait avec des antisera comme suit: (1) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant de Freund dilué au vingtième ; (2) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant alun dilué au vingtième ; (3) pool  
15 d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 ancré en liposomes dilué au vingtième ; (4) l'anticorps monoclonal, qui réagit avec un épitope linéaire de PfMSP1p19, à 50 µg/ml ; (5) pool d'antisera SHI90 provenant d'un vingtaine de singes infectés à répétition par *P. falciparum* et devenus réfractaires à toute infection ultérieure de *P. falciparum*, dilué au cinq  
20 centième ; (6) pool d'antisera des singes naïfs (n'ayant jamais été exposés à *P. falciparum*) dilué au vingtième.

Les résultats montrent que les 3 pools d'antisera des singes vaccinés avec le PfMSP1p19 réagissent de façon importante et spécifique avec des complexes de très haut poids moléculaire (se trouvant de façon  
25 diffuse dans le gel de stacking) et présents dans des extraits de parasite contenant davantage de formes mûres. Ces résultats confortent l'hypothèse de la présence d'une agrégation spécifique du MSP1p19 *in vivo* comportant des épitopes qui sont reproduits dans les molécules recombinantes PfMSP1p19 synthétisées dans le système baculovirus, en  
30 particulier celles en forme d'oligomère.

La figure 7 illustre également ces résultats. Elle se rapporte aux immunoempreintes produites sur gel. Les trois premières colonnes du gel illustrent la réponse in vivo de singes à des injections de p19 [(1) avec l'adjuvant de Freund, (2) avec de l'alun, (3) sous forme de liposome] et notamment l'existence de complexes de haut poids moléculaire confortant l'hypothèse de l'agrégation in vivo de p19 sous forme d'oligomère, spécifique du stade de maturation (quand p42 est coupé en p19 et p33).

Cet essai de vaccination comprend également une troisième injection identique aux précédentes. L'injection avec l'adjuvant de Freund comprend uniquement du FIA.

Il y a deux animaux contrôles pour chaque groupe, à savoir : 2 animaux contrôles injectés avec PBS et l'adjuvant de Freund ; 2 animaux contrôles injectés avec PBS et alun ; 2 animaux contrôles injectés avec liposomes sans protéine ; et deux animaux injectés avec PBS sans adjuvant. La protection est évaluée comme décrit ci-dessus.

**Figure 7B:** Les données pour cette figure sont dérivées de l'essai de vaccination de *P. falciparum* / singe écureuil (Figure 10 ci-après). Les chiffres correspondent aux singes individuels notés dans la Figure 10. Les techniques et méthodes pour cette figure sont les mêmes que pour la Figure 7 sauf que l'antisérum individuel de chaque singe noté a été testé après trois injections le jour de l'infection d'épreuve et l'antisérum SHI a été dilué 1:250. Les résultats montrent que l'antisérum des 4 singes vaccinés avec le p19 et alun réagissent de façon importante et spécifique avec des complexes de très haut poids moléculaire tandis que les singes des autres groupes vaccinés avec le p19 et l'adjuvant de Freund ou des liposomes ne montrent qu'une faible réactivité avec ces complexes. Puisque les singes vaccinés avec p19 et alun ont aussi été le mieux protégés, cette réactivité avec les complexes de haut poids moléculaire paraît indiquer un effet protecteur, et cela malgré qu'un singe dans le

groupe alun n'était pas protégé par rapport aux contrôles et qu'un autre ne l'était que partiellement.

5 L'invention concerne naturellement d'autres applications, par exemple celles exposées ci-après en rapport avec certains des exemples, lesquels ne présentent aucun caractère limitatif.

#### Thérapeutique

10 La molécule recombinante PfMSP1p19 peut être utilisée pour produire des anticorps spécifiques éventuellement utilisables par transfert passif dans un but de thérapeutique adaptée au paludisme sévère dû à *P. falciparum* avec risque de mortalité.

#### Diagnostic

15 Les molécules recombinantes PvMSP1p42 et PvMSP1p19 et PfMSP1p19 dérivées de baculovirus peuvent et ont été utilisées pour produire des anticorps monoclonaux spécifiques murins. Ces anticorps, en combinaison avec des antisera polyclonaux anti MSP1p19 provenant d'une autre espèce telle que le lapin ou la chèvre, peuvent être à la base d'un test de diagnostic semi-quantitatif pour le paludisme et capable de  
20 distinguer entre un paludisme dû à *P. falciparum*, qui peut être mortel, et un paludisme dû à *P. vivax*, qui n'est généralement pas mortel. Le principe de ce test serait de piéger et quantifier toute molécule de MSP1 contenant la partie p19 dans le sang.

25 Dans ce cadre, les avantages de la molécule MSP1p19 sont les suivants:

(i) elle est à la fois extrêmement bien conservée au sein d'une même espèce et suffisamment divergente entre des espèces différentes pour permettre de produire facilement des réactifs spécifiques d'espèce. Aucune réaction croisée n'a été observée entre les anticorps dérivés de  
30 PfMSP1p19 et PvMSP1p19 ;

(ii) la fonction du MSP1p19, bien que non connue avec précision, semble être suffisamment importante pour que cette molécule ne varie pas de façon significative ou soit délétée sans effet létal pour le parasite ;

(iii) c'est un antigène majeur se trouvant sur tous les mérozoïtes et donc, il doit être, en principe, détectable même à basse parasitémie et proportionnellement à la parasitémie ;

(iv) puisque les molécules recombinantes de MSP1p19 dérivées de baculovirus semblent reproduire davantage la structure native de MSP1p19, les anticorps produits contre ces protéines seraient bien adaptés à un usage diagnostique.

Les microorganismes identifiés ci-dessous ont été déposés suivant la règle 6.1. du Traité de Budapest à la date du 01 février 1996, sous les numéros suivants :

15	<u>Références d'identification</u>	<u>Numéros d'enregistrement</u>
	PvMSP1p19A	I - 1659
	PvMSP1p19S	I - 1660
	PfMSP1p19A	I - 1661
	PfMSP1p19S	I - 1662
20	PcMSP1p19S	I - 1663

L'invention concerne également l'utilisation de ces anticorps, alors de préférence préalablement fixés sur un support solide (par exemple pour chromatographie d'affinité), pour la purification de peptides du type p19 initialement contenus dans un mélange.

La purification fait alors intervenir une mise en contact de ce mélange avec l'anticorps, la dissociation du complexe antigène-anticorps et la récupération du peptide de type p19 purifié.

L'invention concerne également des compositions de vaccin, comprenant également des mélanges de protéines ou de fragments, notamment des mélanges du type :



- p19 de *P.falciparum* et p19 de *P.vivax*,
- p19 de *P.falciparum* et p42 de *P.falciparum*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables,
- p19 de *P.vivax* et p42 de *P.vivax*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables,
- p19 de *P.falciparum* et p42 de *P.falciparum*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables, et p19 de *P.vivax* et p42 de *P.vivax*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables.

On entend dans le cas présent définir les régions les plus hypervariables comme la région II ou la région II et la région III en partie ou dans sa totalité, la partie de la région III préférablement déletée étant celle qui est juxtaposée à la région II (la partie conservée se situant du côté C-terminal de la p33, proche de la p19). Les régions II et III sont illustrées en figure 4.

L'invention n'est pas limitée à la production de vaccin humain. Elle s'applique tout autant à la production de compositions de vaccin vétérinaire mettant en oeuvre les protéines ou antigènes correspondants dérivés de parasites infectieux pour des mammifères et produits dans les mêmes conditions. Il est en effet connu que des infections du même type, la babésiose, apparaissent aussi chez les bovins, les canins et les équins. un des antigènes des espèces *Babesia* présente une forte homologie conformationnelle (notamment les deux domaines « EFG-like » et richesse en cystéine) et fonctionnelle avec une partie protéique de MSP-1 [(36), (37) et (38)].

Des exemples de vaccins vétérinaires utilisant un antigène soluble contre de tels parasites on été décrits (39).

Il va sans dire que les p19 mises en oeuvre dans ces mélanges peuvent également donner lieu à toutes les modifications dont il a été

question dans ce qui précède, lorsqu'elle était prise en considération de façon isolée.

## RÉFÉRENCES

- (1) Holder, J.A. et al. (1982) « Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody ». J. Exp. Med. **156** : 1528-1538.
- 5 (2) Howard, R. et al. (1984) « Localization of the major *Plasmodium falciparum* glycoprotein on the surface of mature intracellular trophozoites and schizonts ». Mol. Biochem. Parasitol. **11** : 349-362.
- (3) Pirson, P. et al. (1985) « Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites ». J. Immunol. **134** :  
10 1946-1951.
- (4) Aley, S.B. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: Exoerythrocytic schizonts recognized by monoclonal antibodies against blood-stage schizonts ». Exp. Parasitol. **64** : 188-194.
- (5) Holder, A.A. (1988) « The precursor to major merozoite surface antigen: structure and role in immunity ». Prog. Allergy **41** : 72-97.
- 15 (6) Cooper, J.A. (1993) « Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium* ». Parasitol. Today **9** : 50-54.
- (7) Holder, A.A., et al. (1987) « Processing of the precursor to the major merozoite antigens of *Plasmodium falciparum* » Parasitology **94** : 199-208.
- 20 (8) Lyon, J.A. et al. (1986) « Epitope map and processing scheme for the 195 000-dalton surface glycoprotein of *Plasmodium falciparum* merozoites deduced from cloned overlapping segments of the gene ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 2989-2993.
- (9) Blackman, M.J. et al. (1992) « Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by calcium-dependent  
25 membrane-bound serine protease: shedding of MSP1<sub>33</sub> as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSOP1 ». Mol. Biochem. Parasitol. **50** : 307-316.
- (10) Haldar, K., et al. (1985) « Acylation of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen via sn-1,2-diacyl glycerol. ». J. Biol. Chem. **260** : 4969-  
30 4974.
- (11) Braun Breton, C. et al. (1990) « Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens ». Res. Immunol. **141** : 743-755.

- (12) Kumar, S. et al. (1995) « Immunogenicity and *in vivo* Efficacy of Recombinant *Plasmodium falciparum* Merozoite surface protein-1 in *Aotus* Monkeys ». *Molecular Medicine*, Vol. 1, 3 : 325-332.
- 5 (14) Longacre, S. et al. (1994) « *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus ». *Mol. Biochem. Parasitol.* 64 : 191-205.
- 10 (15) McBride, J.S. et al. (1987) « Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex ». *Mol. Biochem. Parasitol.* 23 : 71-84.
- (16) Blackman, M.J. et al. (1990) « A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies ». *J. Exp. Med.* 172 : 379-382.
- 15 (17) Kaslow, D.C. et al. (1994) « Expression and antigenicity of *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein (MSP<sub>19</sub>) variants secreted from *Saccharomyces cerevisiae* ». *Mol. biochem. Parasitol.* 63 : 283-289.
- (18) Chang, S.P., et al. (1992) « A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth ». *J. Immunol.* 149 : 548-555.
- 20 (19) Longacre, S. (1995) « The *Plasmodium cynomolgi* merozoite surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other *Plasmodium* species ». *Mol. Biochem. Parasitol.* 74 : 105-111.
- 25 (20) Del Portillo, H.A., et al. (1990) « Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 4030-4034.
- (21) Gibson, H.L., et al. (1992) « Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax* ». *Mol. biochem. Parasitol.* 50 : 325-334.
- 30 (22) Dissanaïke, A.S., et al. (1965) « Two new malaria parasites, *Plasmodium cynomolgi ceylonensis* sub sp. nov. and *Plasmodium fragile* sp. nov. from monkeys in Ceylon ». *Ceylon Journal of Medical Science* 14 : 1-9.

- (23) Cochrane, A.H., et al. (1986) « Further studies on the antigenic diversity of the circumsporozoite proteins of the *Plasmodium cynomolgi* complex. ». Am. J. Trop. Med. Hyg. 35 : 479-487.
- 5 (24) Naotunne, T. de S., et al. (1990) « *Plasmodium cynomolgi*: serum-mediated blocking and enhancement of infectivity to mosquitos during infections in the natural host, *Macaca sinica* ». Exp. Parasitol. 71, 305-313.
- (25) Ihalamulla, R.L. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation ». Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81 :  
10 25-28.
- (26) Kimura, E., et al. (1990) « Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived in strains derived from malaria patients ». Gene 91 : 57-62.
- 15 (27) Heidrich, H.-G., et al. (1989) « The N-terminal amino acid sequences of the *Plasmodium falciparum* (FCBI) merozoite surface antigen of 42 and 36 kilodalton, both derived from the 185-195 kilodalton precursor ». Mol. Biochem. Parasitol. 34 : 147-154.
- (28) Blackman, M.J., et al. (1991) « Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound  
20 fragment containing two epidermal growth factor-like domains ». Mol. Biochem. Parasitol. 49 : 29-34.
- (29) Adams, J.M. et al. (1992) « A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites ». Proc. Natl. Acad. Sci, 89:7085-7089.
- 25 (30) Sim B.K.L. (1995) « EBA-175: An erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum* ». Parasitology Today, vol.II, n°6:213-217.
- (31) Sim B.K.L. (1994) « Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum* ». Science, 264:1941-1944.
- (32) Davies, A. et al. (1993), Biochem J. 295 (Pt3) : 889-896. « Expression of  
30 the glycosylphosphatidylinositol-linked complement-inhibiting protein CD59 antigen in insect cells using a baculovirus vector ».

- (33) Haziot A. et al. (1994) J. Immunol. 152 : 5868. « Recombinant soluble CD14 Inhibits LPS-Induced Tumor Necrosis Factor & Production by Cells in Whole Blood ».
- (34) Chang, S.P. et al., (1988) « *Plasmodium falciparum* : gene structure and hydropathy profile of the major merozoite surface antigen (gp195) of the Uganda-Palo Alto isolate. Exp. Parasitol. 67 : 1-11.
- (35) Holder, A.S. et al. (1985) « Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites, Nature 317 : 270-273.
- (36) G. Bourdoiseau et al. (mai 1995) « Les babésioses bovines », Le point vétérinaire, vol.27, n°168.
- (37) P. Bourdeau et al. (mai 1995) « La babésiose canine à *Babesia canis* », Le point vétérinaire, vol.27, n°168.
- (38) C. Soulé (mai 1995) « Les babésioses équine », Le point vétérinaire, vol.27, n°168.
- (39) T.P.M. Schetters et al. (1995) « Vaccines against Babesiosis using Soluble Parasite Antigens », Parasitology Today, vol.11, n°12.
- (40) P.A. Burghaus et al. (1996) « Immunization of *Aotus nancymai* with Recombinant C Terminus of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 in Liposomes and Alun Adjuvant Does Not Induce Protection against a Challenge Infection », Infection and Immunity, 64:3614-3619.
- (41) S.P. Chang, et al. (1996) « A Recombinant Baculovirus 42-Kilodalton C-Terminal Fragment of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Protects *Aotus* Monkeys against Malaria », Infection and Immunity, 64: 253-261.
- (42) L.H. Miller et al. (1997) « The Need for Assays Predictive of Protection in Development of Malaria Bloodstage Vaccines », Parasitology Today, vol.13, n°2:46-47.

L'invention concerne également les hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux

pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaissant pas *Plasmodium vivax*.

En particulier, ces hybridomes sécrètent des anticorps monoclonaux qui reconnaissent pas la p19 de *Plasmodium vivax* et qui reconnaissent  
5 spécifiquement la p19 de *Plasmodium falciparum*.

L'invention concerne également un hybridome caractérisé en ce qu'il produit un anticorps spécifique qui reconnaît spécifiquement la p19 de *P.vivax* et la p19 de *P.cynomolgi*. Un hybridome F10-3 a été construit à partir du myélome X63 Ag8 653 produisant des IgG 2b/k reconnaissant la  
10 glycoprotéine p42 de *Plasmodium vivax*.

## REVENDICATIONS

- 5           1.     Protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :
- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, autre que *Plasmodium vivax*, et infectieux pour des mammifères, notamment l'Homme, ce fragment C-terminal restant  
10           normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
  - soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire  
15           une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
  - soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et  
20           cette protéine recombinante comportant le cas échéant des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.
- 25           2.     Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est reconnue par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant ou contre un *Plasmodium* homologue lorsqu'elle est à l'état non réduit ou dans un état réduit non irréversible, mais non reconnue ou peu reconnue par ces mêmes antisérums, lorsqu'elle est irréversiblement réduite.



3. Protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle inhibe la réactivité d'un antisérum humain immune avec la p42 correspondante produite dans les mêmes conditions, aussi bien que cette p42 elle-même et que la p42 peut seulement  
5 partiellement inhiber la réactivité dudit antisérum humain contre la p19.

4. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique C-terminale de la p33 (fragment N-terminal de  
10 33 kDa) normalement du côté associé à la p19 dans la p42 correspondante, avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière séquence polypeptidique C-terminale de la p33 comportant, lorsqu'elle est présente, moins de 50 résidus d'acides aminés.

5. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique du côté C-terminal de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement associée à la p19 dans la p42 correspondante avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière  
20 séquence polypeptidique C-terminale de la p33, comportant, lorsqu'elle est présente, moins de 35, voire même moins de 10 résidus d'acides aminés.

6. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique du côté C-terminal de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement associée à la p19 dans la p42 correspondante avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière  
25 séquence polypeptidique C-terminale de la p33 étant limitée, lorsqu'elle est présente, à celle qui conserve un degré de conservation substantiel dans les *Plasmodium* infectieux pour l'homme, tels que *P.falciparum* ou *P.vivax*.  
30

7. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la partie de fragment p19 contient au moins l'une des deux régions EGF normalement contenues dans cette p19.
- 5 8. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le poids moléculaire de ce fragment p19 ou de cette partie de fragment p19 est comprise entre 10 et 25 kDa, notamment entre 10 et 15 kDa.
- 10 9. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle comporte également un groupe glycosylphosphatidylinositol (GPI) du type de ceux qui permettent un ancrage du fragment p19 à l'hôte cellulaire, notamment une cellule eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus, dans lequel ladite protéine recombinante est exprimée.
- 15 10. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est dépourvue de la partie C-terminale extrême hydrophobe qui intervient dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule
- 20 eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.
11. Protéine recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle est hydrosoluble.
- 25 12. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence de la p19 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium falciparum* ou ladite partie du fragment correspondant.
13. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence de

la p19 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium cynomolgi* ou ladite partie du fragment correspondant.

14. Oligomère de la protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

5 15. Oligomère selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il contient de 2 à 50 unités monomère de ladite séquence polypeptidique de la protéine recombinante telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 13.

10 16. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce qu'elle est conjuguée à une molécule porteuse utilisable pour la production de vaccins.

15 17. Composition vaccinnante contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif une protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
  - soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
  - 25 ◦ soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et
- cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité

des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

18. Composition vaccinnante selon la revendication 17, caractérisée en ce que son principe actif consiste en une protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 2 à 13 ou 16, ou en un oligomère selon la revendication 14 ou 15.

19. Composition vaccinnante contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif un oligomère d'une protéine recombinante selon la revendication 17 ou la revendication 18.

20. Anticorps reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

21. Anticorps selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est monoclonal.

22. Anticorps selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est monoclonal et en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. falciparum*.

23. Anticorps monoclonal selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. vivax*.

24. Procédé de diagnostic différentiel permettant de distinguer entre une infection parasitaire due à *P. vivax*, d'une part, et une infection parasitaire due à un autre *Plasmodium*, d'autre part, caractérisé par les mises en contact d'un prélèvement biologique infecté par un *Plasmodium* avec un anticorps selon la revendication 23, d'une part, et avec un anticorps selon la revendication 21 ou 22, d'autre part, et la détection selon le cas, de la production ou non d'une réaction immunologique.

25. Vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible

- d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence nucléotidique codant pour un peptide signal compatible avec l'expression dans un système baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :
- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
  - soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
  - soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée.

26. Vecteur modifié selon la revendication 25, caractérisé en ce que la susdite deuxième séquence polypeptidique est conforme à celle définie dans l'une quelconque des revendications 2 à 13.

27. Vecteur modifié selon la revendication 25, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est une séquence synthétique.

28. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique code pour un peptide signal issu de *Plasmodium vivax* et normalement associé à la protéine MSP-1 de ce *Plasmodium*.

29. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 25 à 28, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence d'extrémité C-terminale hydrophobe qui est impliquée dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

30. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 25 à 29, caractérisé en ce qu'il consiste en un baculovirus modifié.

31. Organisme, notamment cellule d'insecte du type Sf9, transfectable et transfecté par le vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 25 à 29.

32. ADN synthétique contenant une première séquence nucléotidique dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte *Plasmodium falciparum*, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de cet ADN dans un système baculovirus est apte à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% du total des nucléotides dont est constitué le susdit ADN synthétique.

33. ADN synthétique selon la revendication 32, caractérisé en ce que sa première séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence codant pour la région d'extrémité C-terminale hydrophobe normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine p19 à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

34. ADN synthétique selon la revendication 32 ou la revendication 33, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique est précédée d'une séquence nucléotidique signal codant pour un peptide signal normalement associé à une protéine MSP-1 de *Plasmodium*, homologue ou hétérologue vis-à-vis de la séquence principale.

35. ADN synthétique selon la revendication 34, caractérisé en ce que la séquence signal est issue de *P. vivax*.

36. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 32 à 35, caractérisé en ce que la susdite première séquence nucléotidique inclut une séquence 3'-terminale codant pour une région polypeptidique d'ancrage à la membrane cellulaire, ladite région d'ancrage se fixant sur la protéine recombinante exprimée à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé avec un vecteur contenant ledit ADN synthétique, ladite séquence 3' étant homologue à celle de la séquence nucléotidique principale, ou hétérologue, notamment celle issue de *P. vivax*.

37. ADN synthétique selon la revendication 36, caractérisé en ce que la séquence 3'-terminale est issue de *P. vivax*.

38. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 32 à 36, caractérisé en qu'il est dépourvu de ladite séquence 3'-terminale.

39. Vecteur de type baculovirus selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1659
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1660
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1661
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1662
- 5 ◦ le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1663.

40. Hybridome sécréteur d'anticorps monoclonaux ayant les spécificités des anticorps selon l'une quelconque des revendications 21 à 23.

10 41. Procédé de séparation d'un peptide p19 de spécificité donnée à partir d'un mélange de peptides, caractérisé par la mise en contact de ce mélange de peptides avec un anticorps correspondant, conforme à l'une quelconque des revendications 20 à 23, de préférence préalablement fixé sur un support insoluble, par la dissociation ultérieure du composé antigène-anticorps formé et par la récupération du peptide  
15 p19 purifié.

42. Utilisation de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou de l'oligomère selon la revendication 15 ou 16 pour la préparation d'une composition immunogène susceptible d'induire une réponse immune contre une infection à *Plasmodium*.

20 43. Composition de vaccin comprenant à titre de principes actifs un mélange d'une protéine conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 13 et soit de la p42 correspondante, celle-ci étant le cas échéant déletée de ses parties les moins conservées, soit d'une autre protéine recombinante, de type p19 ou p42, provenant d'un parasite  
25 homologue de celui dont est issu la susdite protéine.

44. Composition de vaccin selon la revendication 23 caractérisée en ce que son mélange de principes actifs est choisi parmi les mélanges suivant :

- p19 de *P.falciparum* et p19 de *P.vivax*,
- 30 - p19 de *P.falciparum* et p42 de *P.falciparum*,



- p19 de *P.vivax* et p42 de *P.vivax*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables,
- p19 de *P.falciparum* et p42 de *P.falciparum*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables, et p19 de *P.vivax* et
- 5 p42 de *P.vivax*, celle-ci étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables.

45     Hybridome selon la revendication 40, caractérisé en ce qu'il a été déposé à la CNCM (Paris, France) sous le numéro I-1846, le 14 février 1997.

**This Page Blank (uspto)**

**FIGURE 1A**

Bac 19	E F N I S Q H Q C V K K P E N GAA <u>TTC</u> AAC ATC TCG CAG CAC CAA TGC GTG AAA AAA CAA TGT CCC GAG AAC 
--------	---

FIGURE 1b

		Site Eco RI																							
		E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N							
Bac 19		GAA TTC AAC ATC TCG CAG CAC CAA TGC GTG AAA AAA CAA TGT CCC GAG AAC																							
PF 19																									
		AAC ATT TCA CAA CAC CAA TGC GTA AAA AAA CAA TGT CCA GAA AAT																							
Bac 19		S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L							
PF 19		TCT	GGC	TGT	TTT	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG							
		TCT	GGA	TGT	TTT	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA							
Bac 19		N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C							
PF 19		AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT							
		AAT	TAC	AAA	CMA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT							
Bac 19		N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D							
PF 19		AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC							
		AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	CCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT							
Bac 19		S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S							
PF 19		TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG							
		TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT							
Bac 19		Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	S	S	N	F	L	G	I							
PF 19		TAC	CCG	CTG	TTT	GAC	GGC	ATC	TTT	TGC	AGC	TCC	TCT	AAC	TTT	TTG	GGC	ATC							
		TAT	CCA	CTT	TTT	GAT	GGT	ATT	TTT	TGC	AGT	TCC	TCT	AAC	TTT	TTA	GGA	ATA							
Bac 19		S	F	L	L	I	L	M	L	I	L	Y	S	F	I	.	.								
PF 19		TCG	TTT	TTG	TTG	ATC	CTT	ATG	TTG	ATC	TTG	TAC	AGC	TTT	ATT	TAA	TAA								
		TCA	TTT	TTA	TTA	ATA	CTT	ATG	TTA	ATA	TTA	TAC	AGT	TTT	ATT										

FIGURE 1C

ATG AAG GCG CTA CTC TTT TTG TTC TCT TTC ATT TTT TTC GTT ACC AAA TGT  
 M K A L L F L F S F I F F V T K C  
  
 CAA TGT GAA ACA GAA AGT TAT AAG CAG CTT GTA GCC AAC GTG GAC GAA TTC  
 Q C E T E S Y K Q L V A N V D E F  
  
 AAC ATC TCG CAG CAC CAA TGC GTG AAA AAA CAA TGT CCC GAG AAC TCT GGC  
 N I S Q H Q C V K K Q C P E N S G  
  
 TGT TTC AGA CAC TTG GAC GAG AGA GAG GAG TGT AAA TGT CTG CTG AAC TAC  
 C F R H L D E R E E C K C L L N Y  
  
 AAA CAG GAG GGC GAC AAG TGC GTG GAG AAC CCC AAC CCG ACC TGT AAC GAG  
 K Q E G D K K C V E N P N P T C N E  
  
 AAC AAC GGC GGC TGT GAC GCA GAC GCC AAA TGC ACC GAG GAG GAC TCG GGC  
 N N G G C D A D A K C T E E D S G  
  
 AGC AAC GGC AAG AAA ATC ACG TGT GAG TGT ACC AAA CCC GAC TCG TAC CCG  
 S N G K K I T C E C T K P D S Y P  
  
 CTG TTC GAC GGC ATC TTC TGC AGC TAA TAA  
 L F D G I F C S \* \*

FIGURE 1D

GAA	ACA	GAA	AGT	TAT	AAG	CAG	CTT	GTA	GCC	AAC	GTG	GAC	GAA	TTC
E	T	E	S	Y	K	Q	L	V	A	N	V	D	<u>E</u>	<u>F</u>
AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC
N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA	*	*			
L	F	D	G	I	F	C	S	*	*					

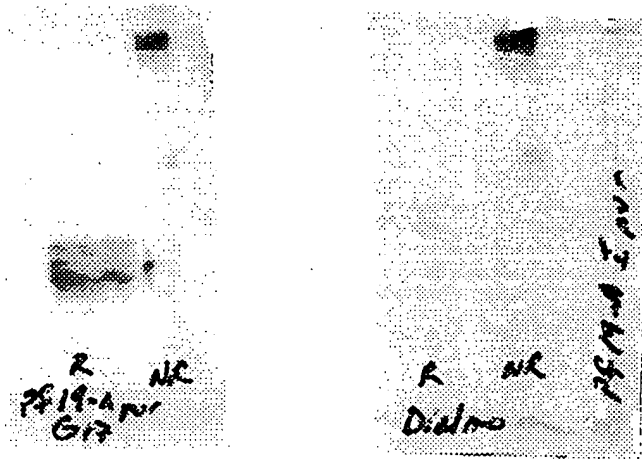
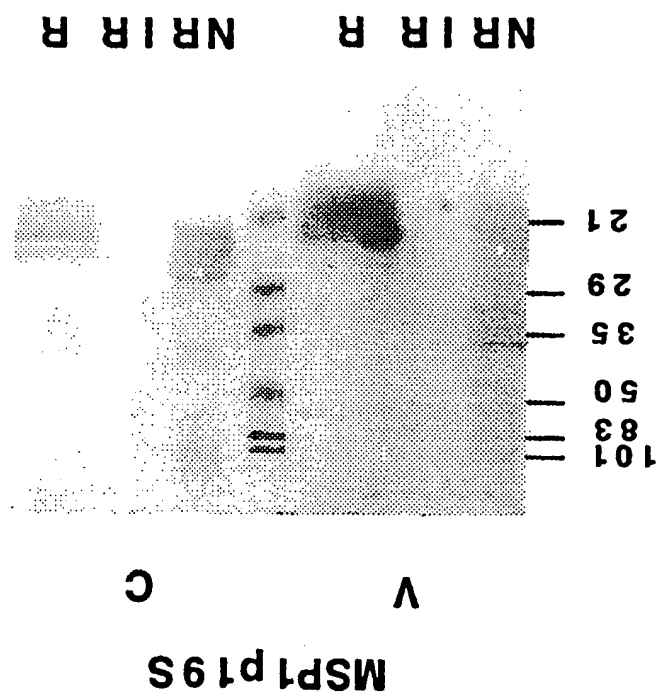


FIGURE 2

FIGURE 28





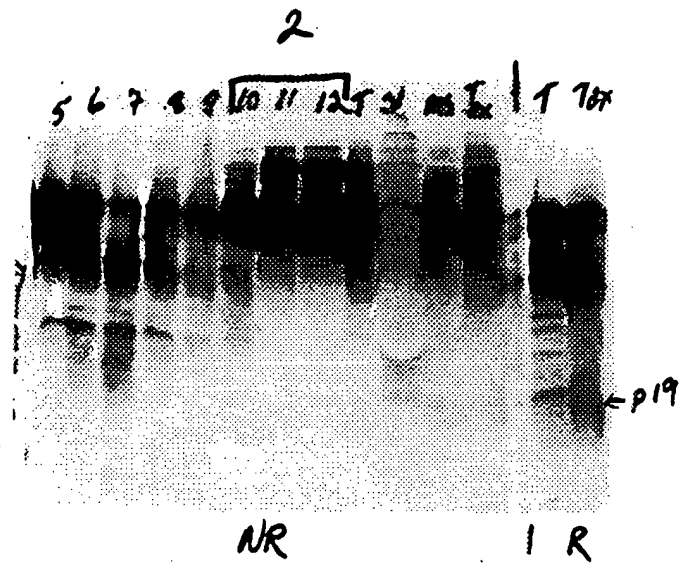


FIGURE 3

# INHIBITION D'ELISA PAR DES ANTIGENES MSP-1 P42 ET P19 DE P. VIVAX

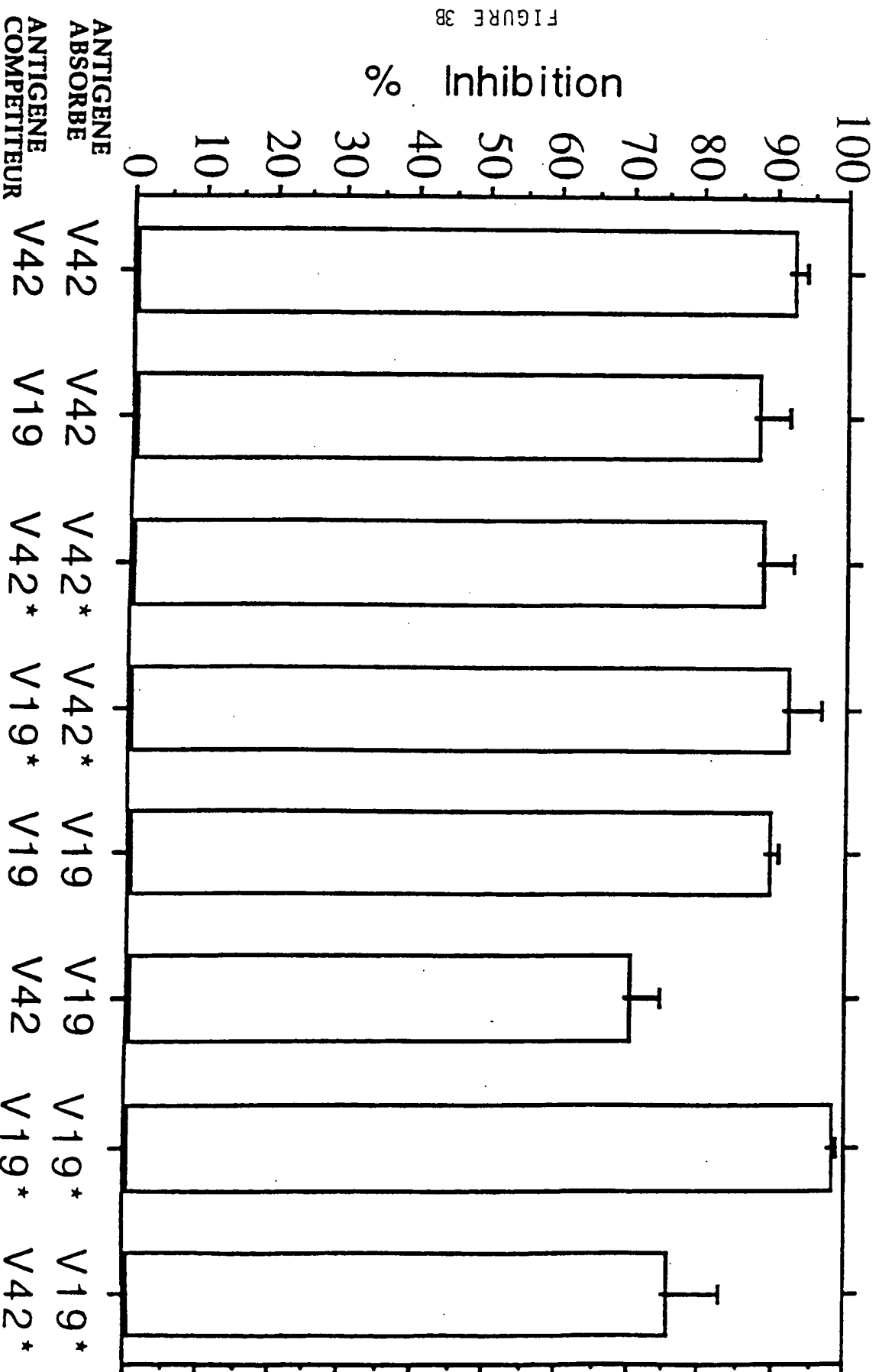


FIGURE 38

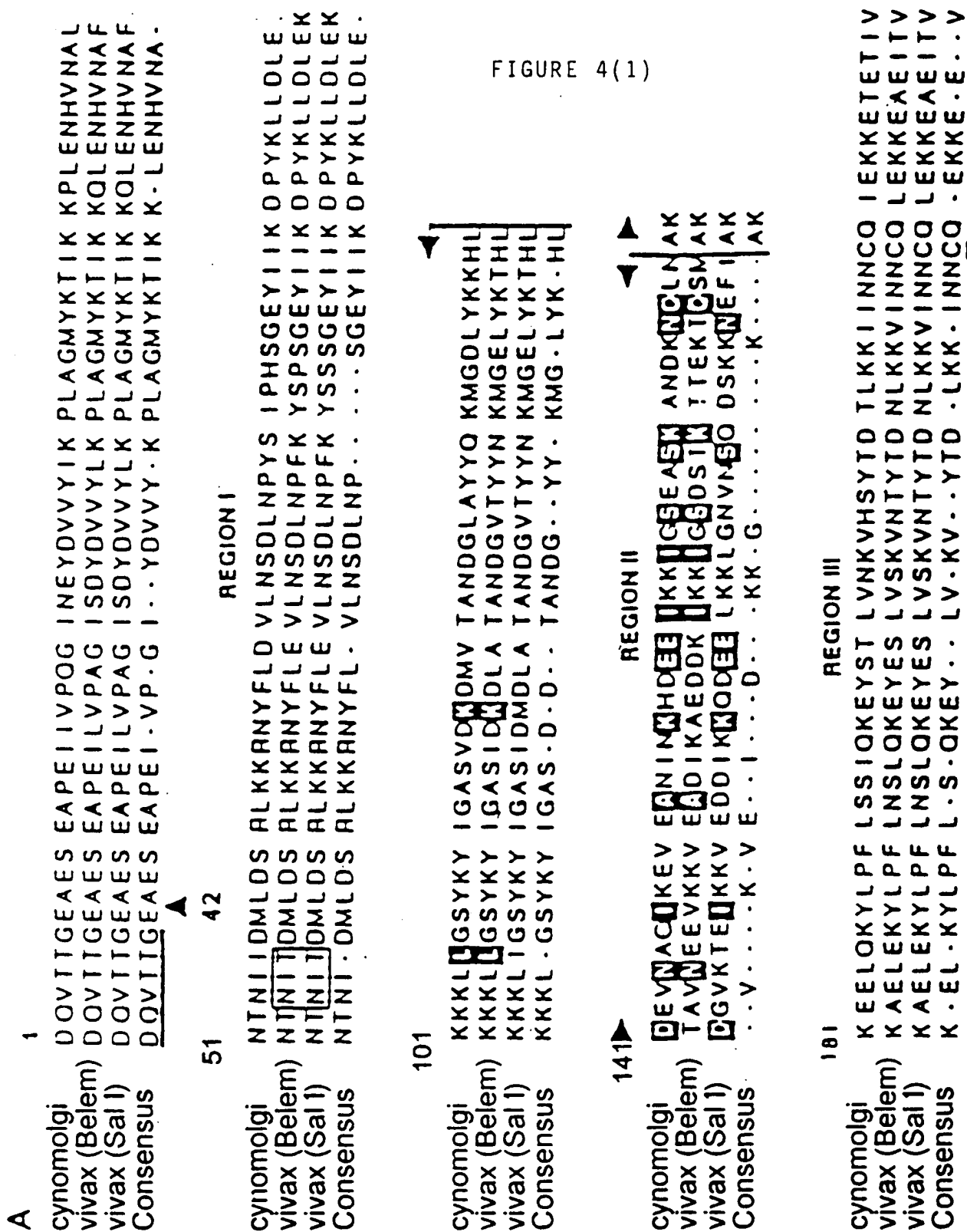
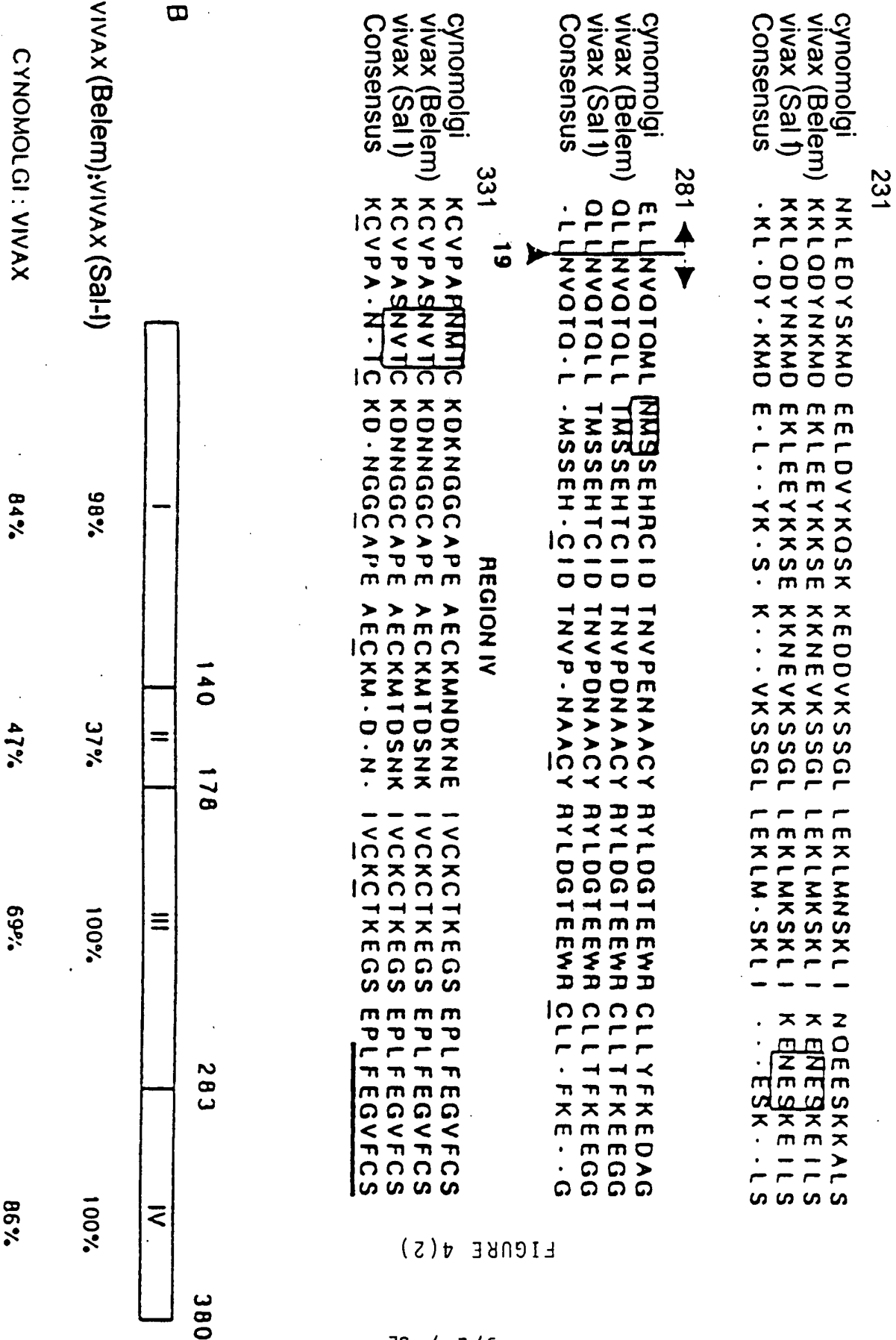


FIGURE 4 (2)



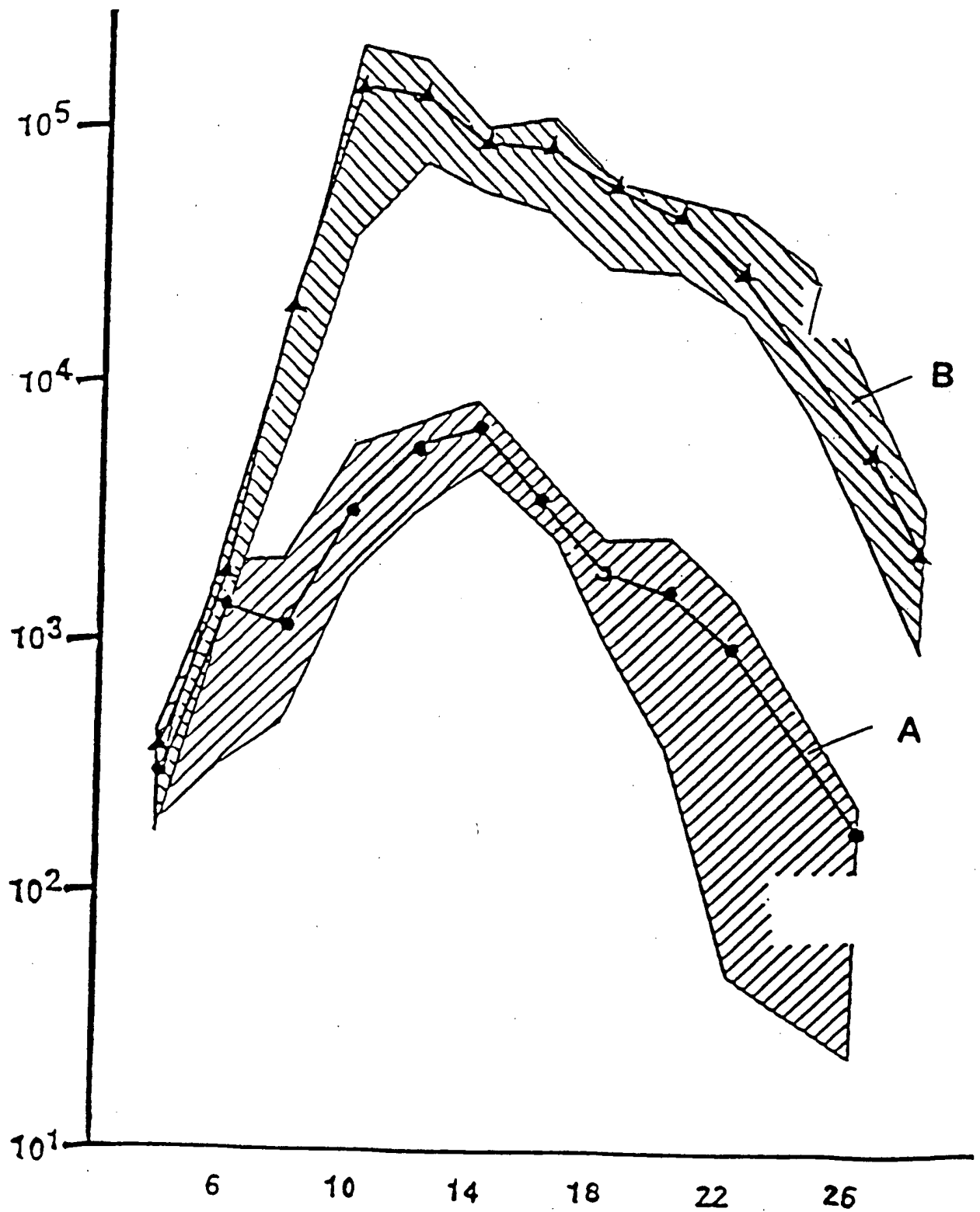


FIGURE 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

# FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 68

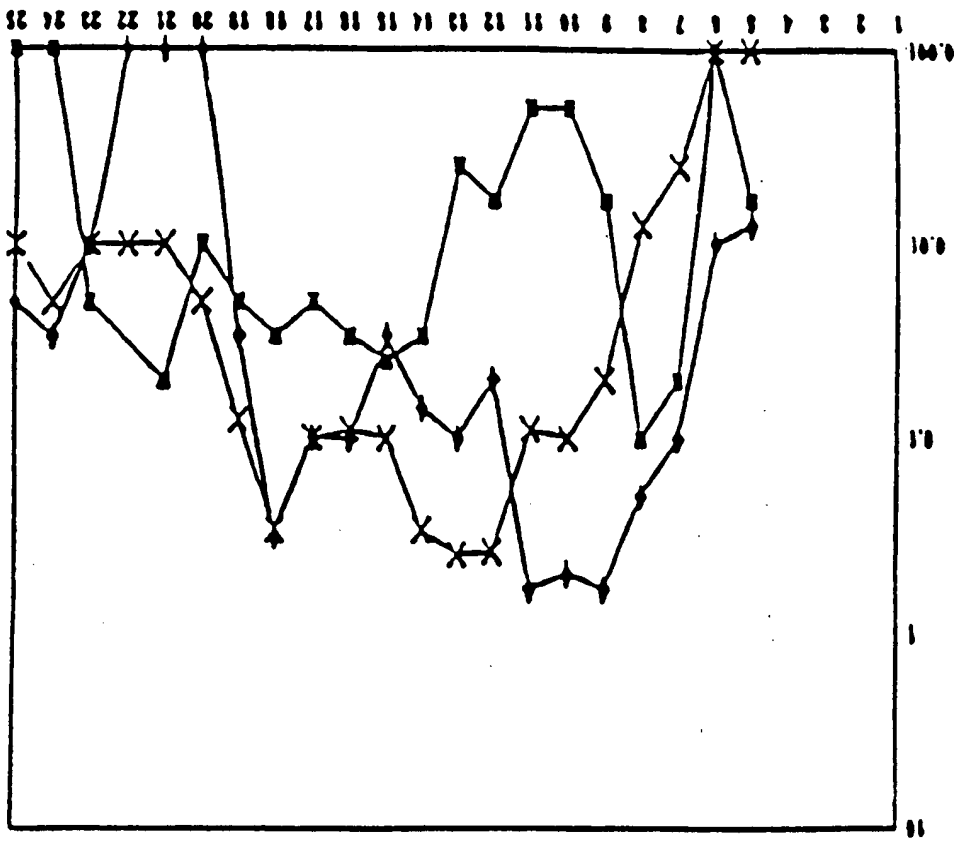
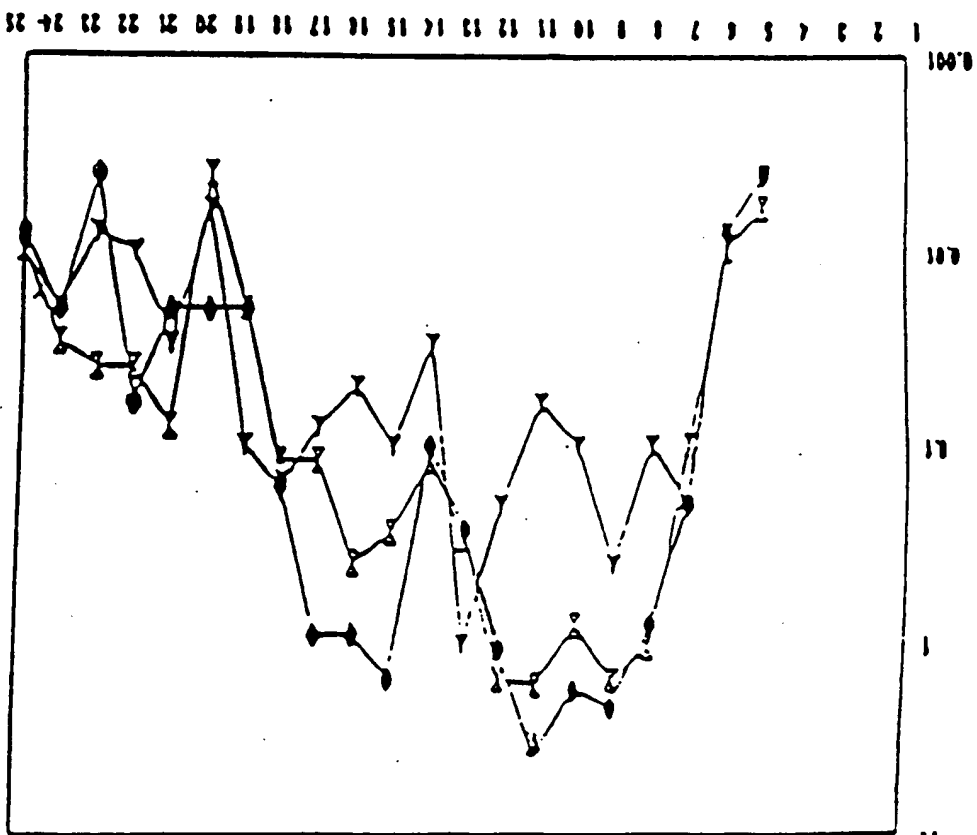


FIGURE 6A



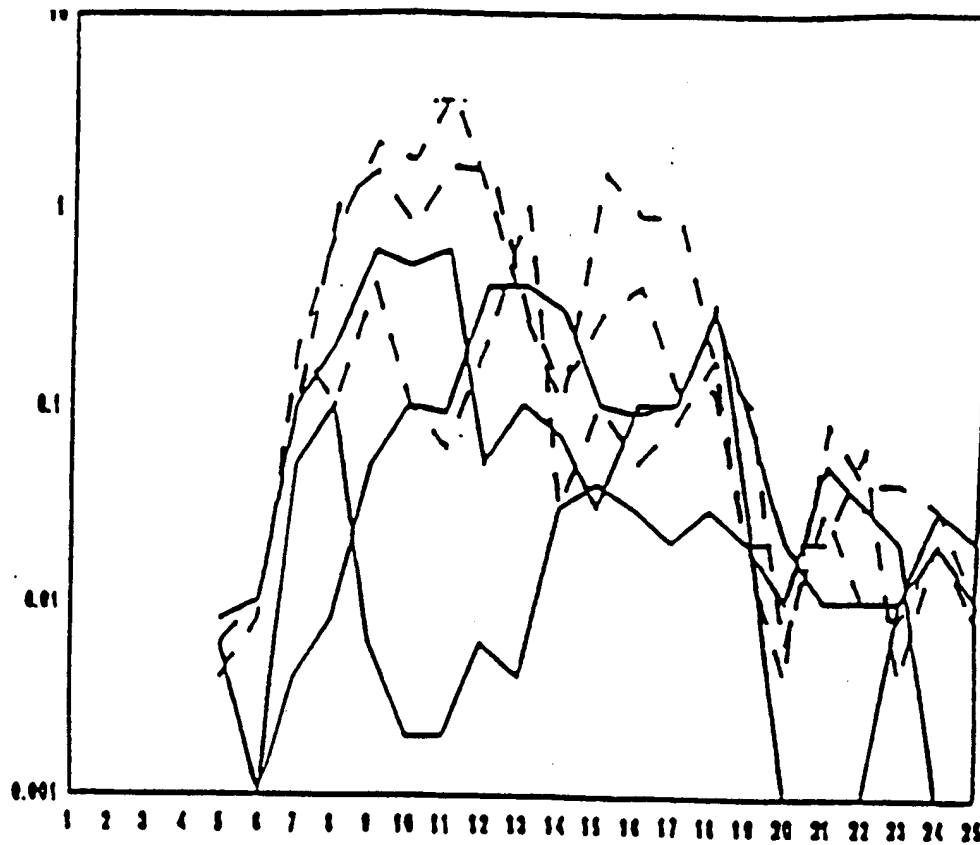


FIGURE 6C

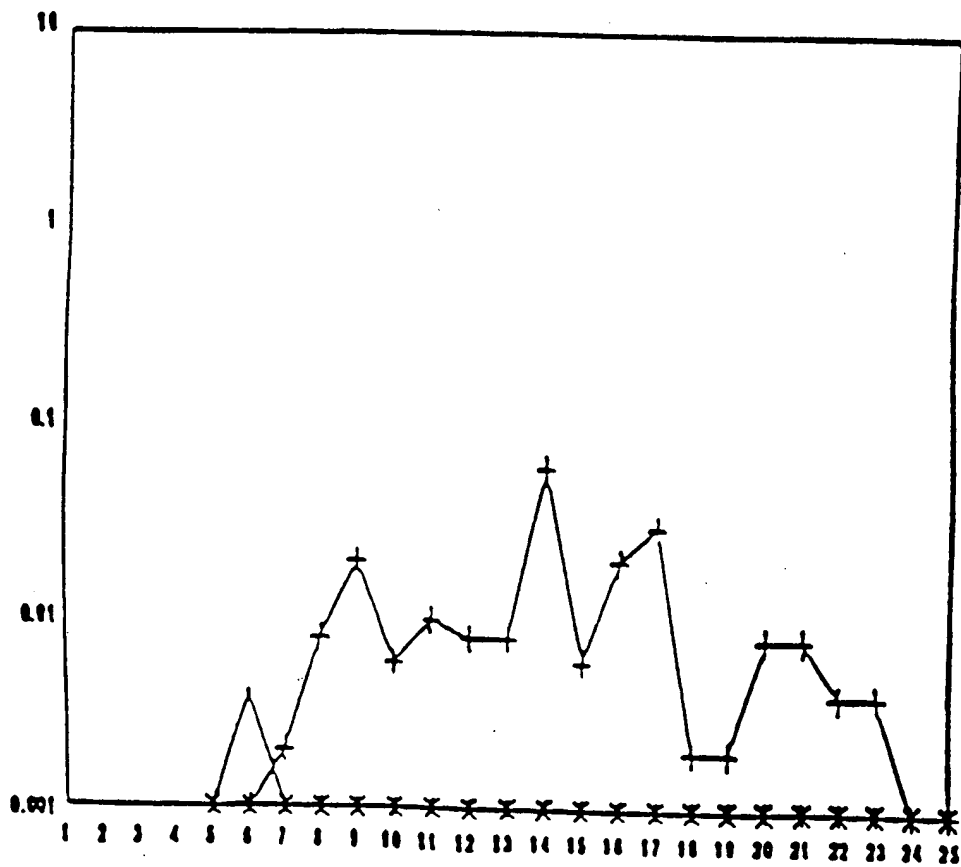


FIGURE 6D

# FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 6F

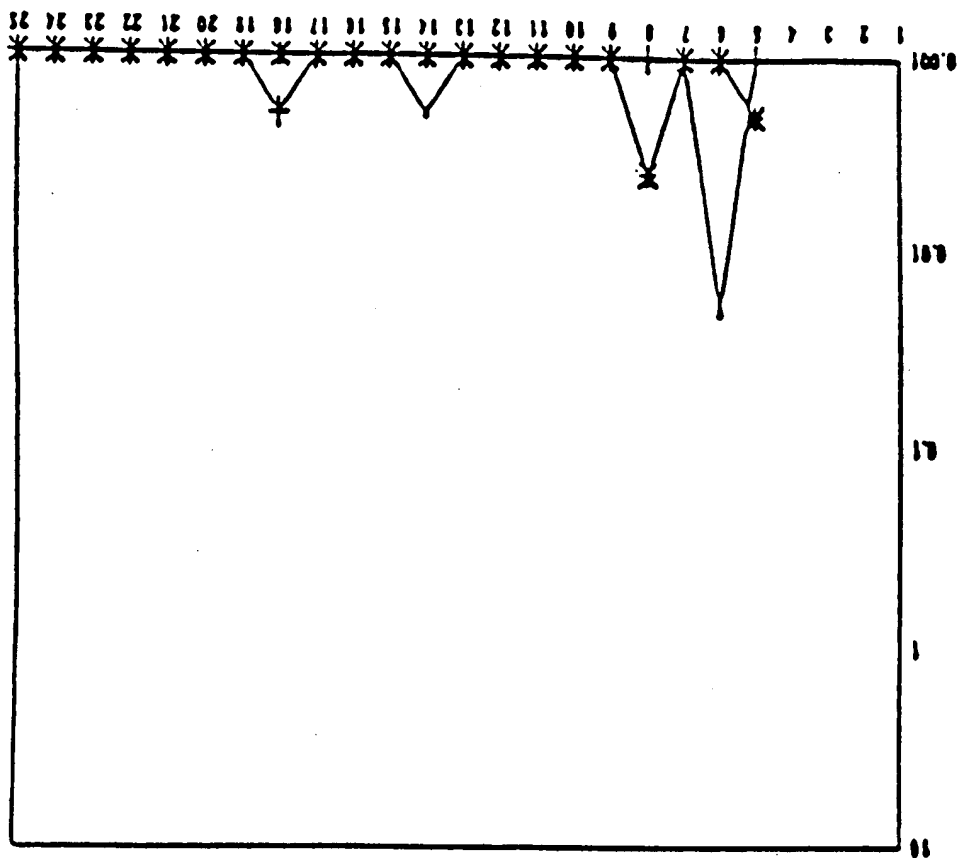
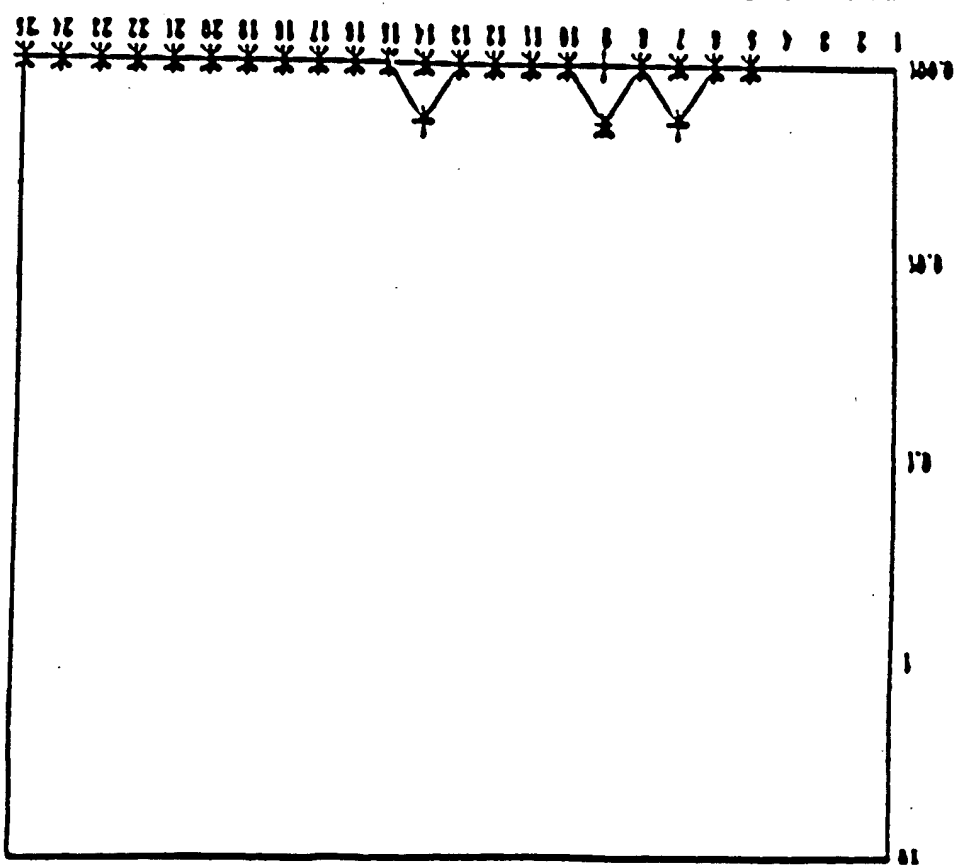


FIGURE 6E





# Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p42 et p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica*

		95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
Année		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Mois		19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1				
Jour		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18				
Jours post-infection																			
Vaccination p42	T434	-	.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T435	-	-	.002	.008	.02	.006	.01	.008	.008	.06	.006	.02	.03	.002				
	T428	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaccination p19	T429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T426	-	.002	-	-	-	-	-	-	-	.002	-	-	-	-	-	-	-	-
	T427	-	-	-	.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaccination p42+p19	T430	-	.02	-	-	-	-	-	-	-	.002	-	-	-	-	-	-	-	-
	T431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.002				
	T433	.002	-	-	.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrôles Eau physiologique, FCA/FLA	T425	.006	-	.05	0.1	.006	.002	.002	.006	.004	.03	.04	.03	.02	.03				
	T436	-	-	.004	.008	0.05	0.1	0.09	0.39	0.4	0.3	0.1	0.09	0.1	.3				
	T438	.008	0.01	0.1	0.2	0.6	0.5	0.6	0.05	0.1	0.07	0.03	0.1	0.1	.32				
Contrôles Non-vaccinés	T437	.004	.008	0.2	0.1	0.4	0.1	0.06	0.2	1.0	0.03	0.1	0.05	0.08	.17				
	T440	.006	.01	0.1	1.04	1.5	1.8	1.6	1.5	0.3	0.12	0.28	0.4	0.12	.12				
	T441	.004	.008	0.2	0.8	2.1	1.7	3.8	1.04	0.27	0.1	1.5	0.9	0.9	.16				

— = Absence de parasites dans 400 champs microscopiques

FIGURE 6G(1)

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p42 et p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica*

Année	Mois	Jour	Jours post-infection																										
				95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
				8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
				2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15												
			19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32													
Vaccination p42	T434	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T435	.002	.008	.008	.004	.004	.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T428	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaccination p19	T429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T426	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T427	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaccination p42+p19	T430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T433	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrôles Eau physiologique, FCA/FIA	T425	.02	.01	.05	ND	.02	-	-	-	.004	.004	.01	.06	.04	.03	.03	.008	.02	.04	.008	.04	.03	.008	.004	.004	.004	.004	.004	.008
	T436	.08	.02	.01	.01	.01	.02	.02	.01	.01	.008	.02	.06	.004	.008	.004	.02	.004	.008	.004	.004	.008	.004	.004	.004	.004	.004	.004	.004
	T438	.03	-	-	-	.01	.03	.02	.02	.04	.01	.05	.004	.008	.01	.05	.004	.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrôles Non-vaccinés	T437	.1	.006	.03	.01	.008	.02	.01	.008	.01	.01	.01	.008	.01	.01	.01	.008	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01
	T440	.02	.004	.08	.04	.04	.03	.01	.01	.01	.04	.02	.005	.03	.004	.008	.004	.004	.004	.004	.004	.008	.008	.008	.004	.004	.004	.004	.004
	T441	.02	.02	.02	.06	.004	.02	.008	.01	.008	.01	.008	.004	.004	.008	.008	.004	.004	.008	.008	.008	.008	.008	.008	.008	.008	.008	.008	.004

— = Absence de parasites dans 400 champs microscopiques

FIGURE 66(2)

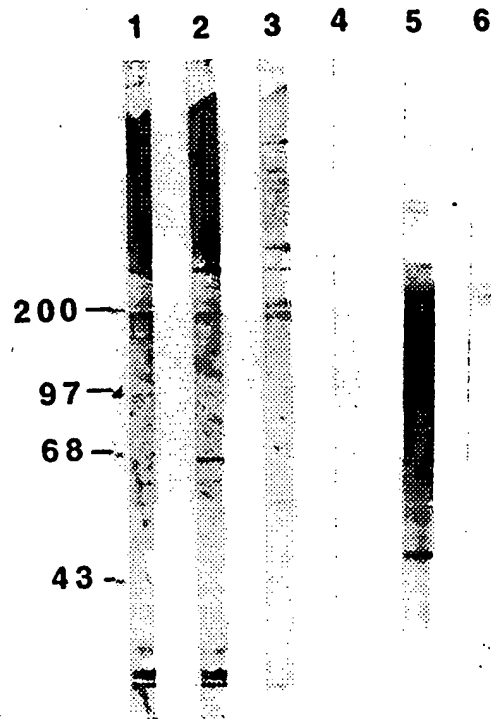
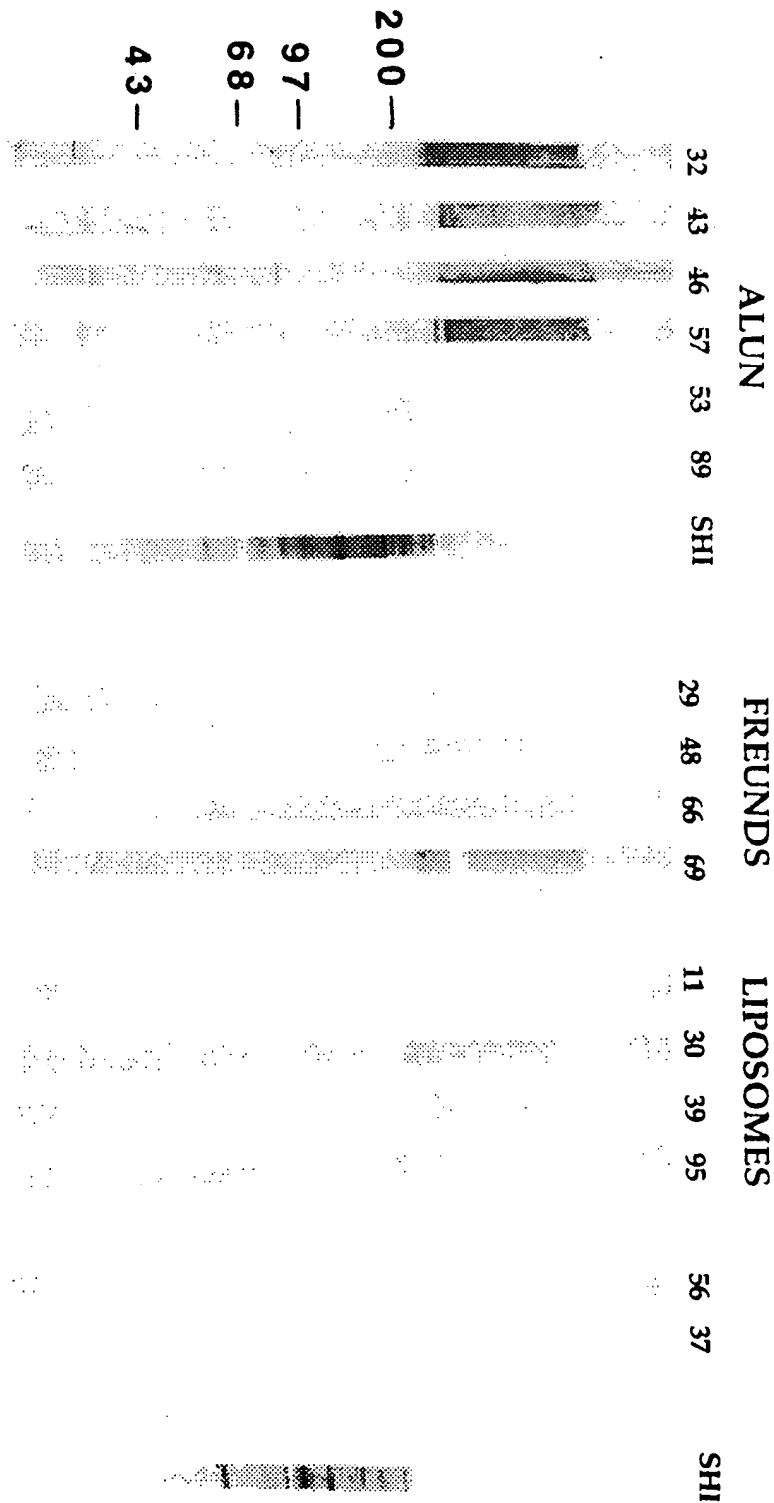


FIGURE 7

FIGURE 7B



Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

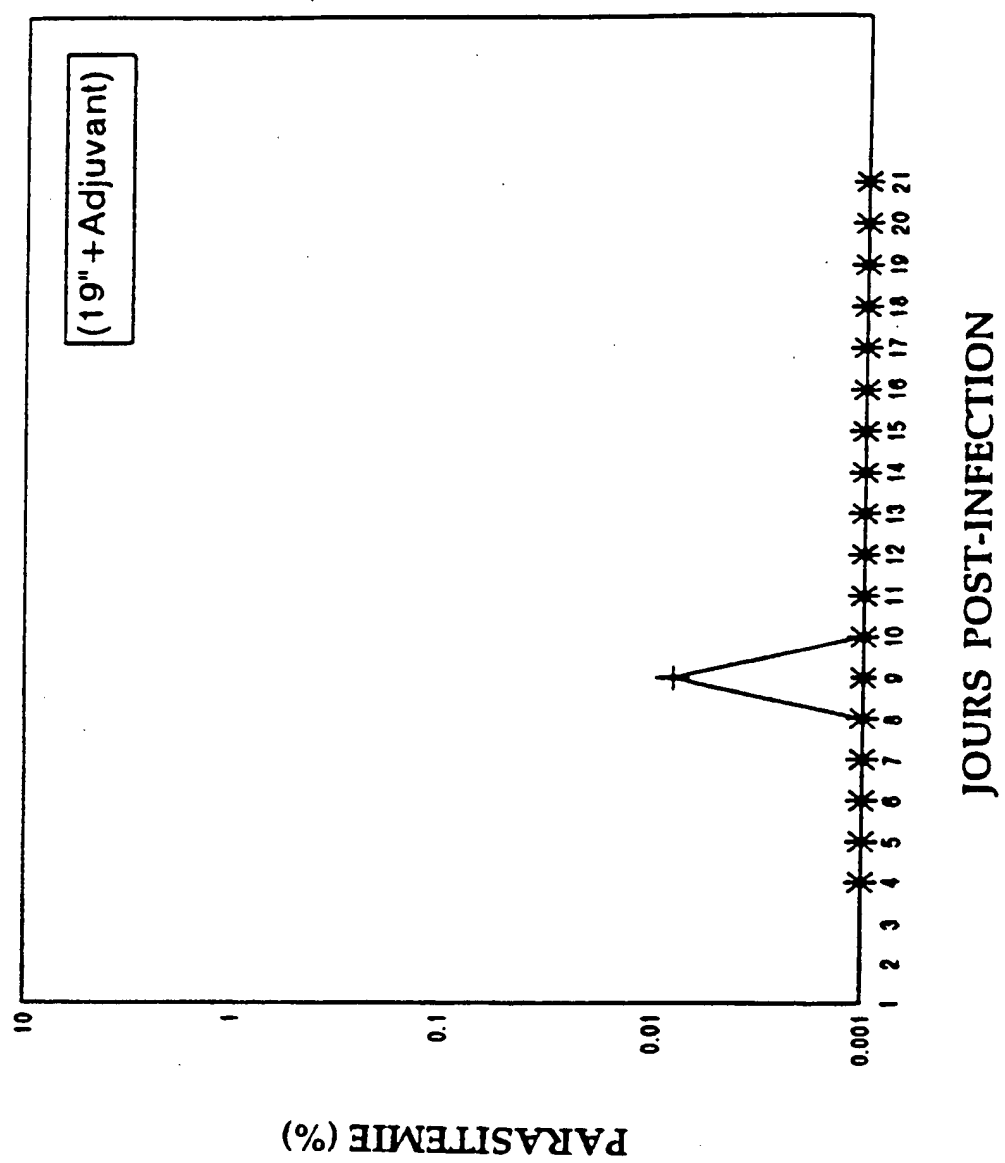
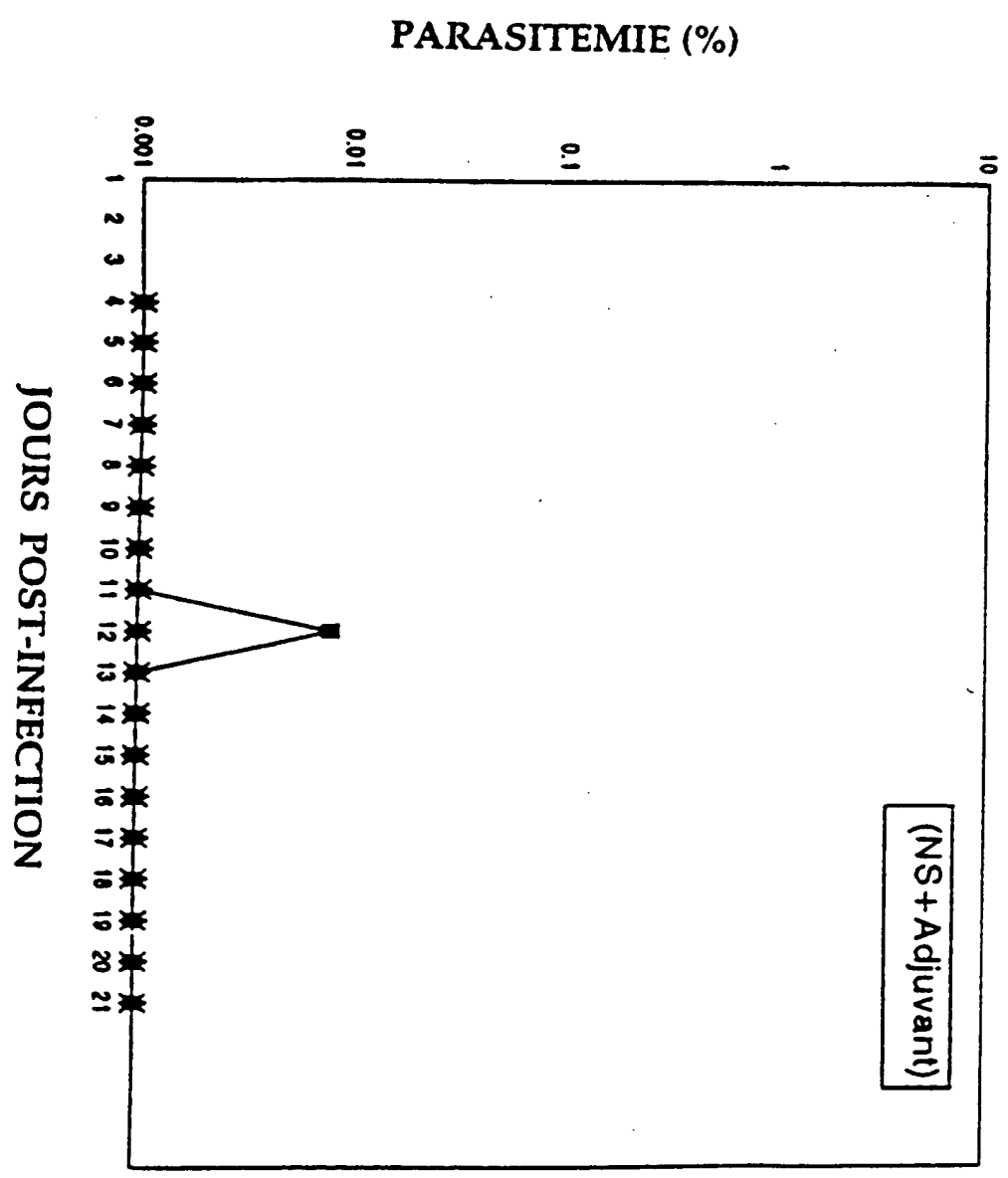


FIGURE 8A

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

FIGURE 88



Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

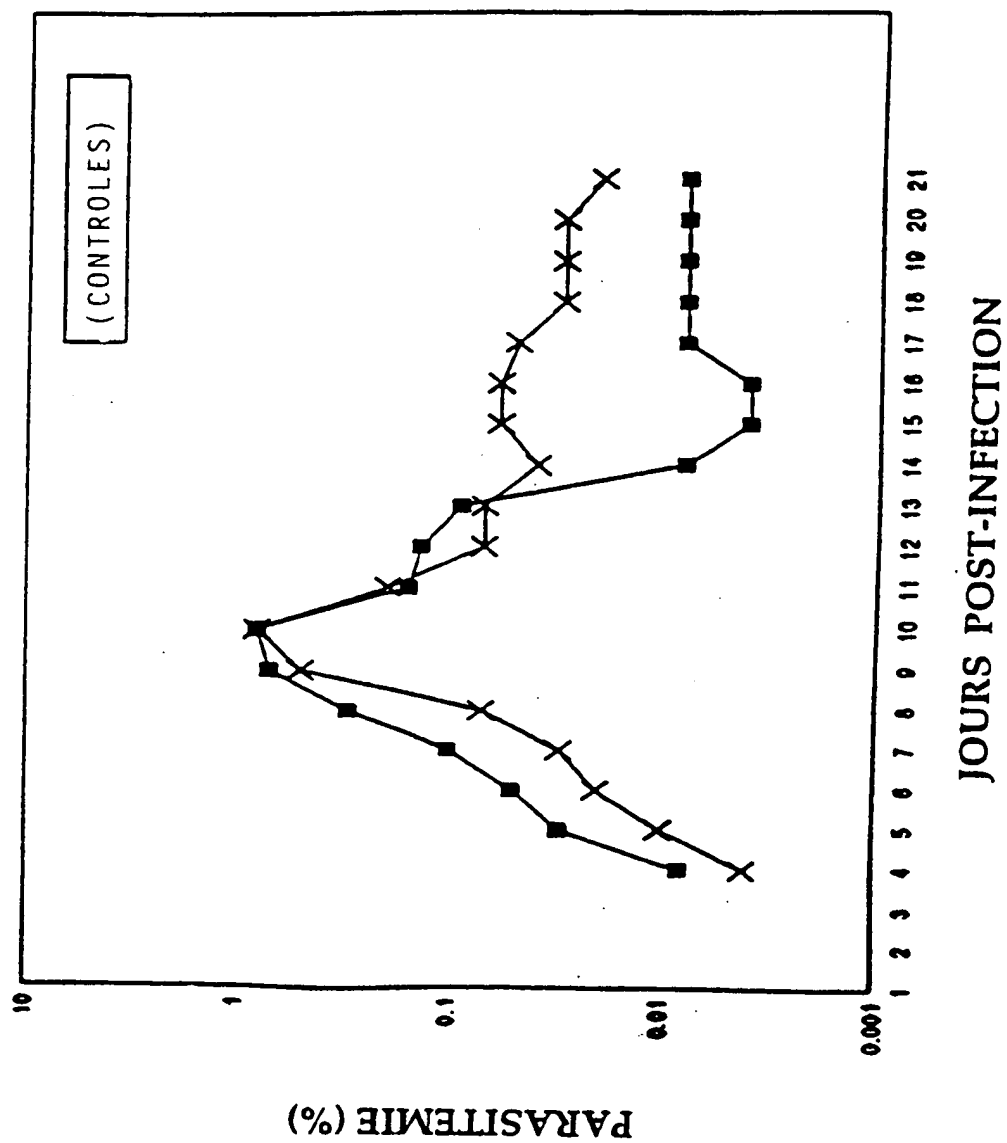


FIGURE 8C

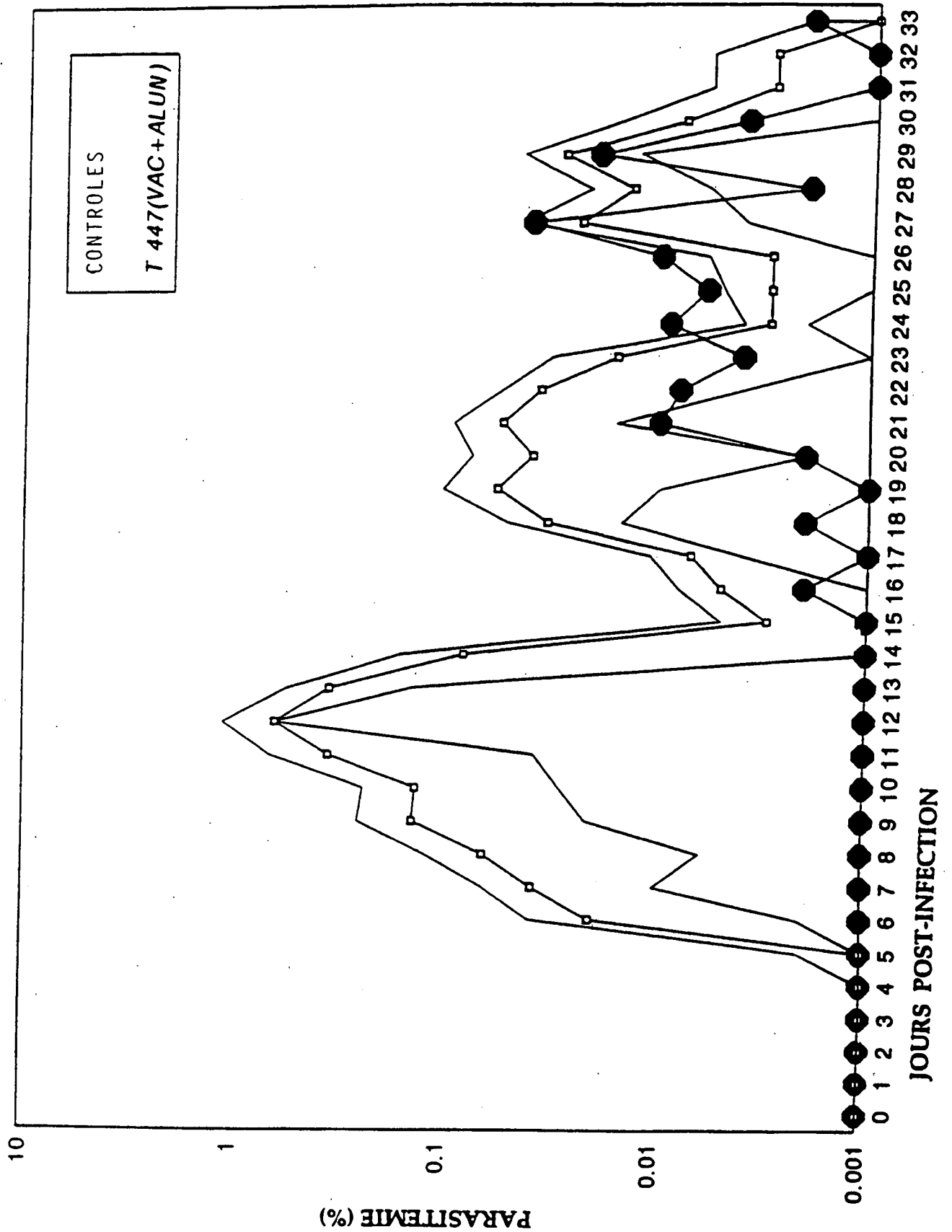
— = Absence de parasites dans 400 champs microscopiques

Année	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
Mois	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Jours post-infection	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Nombre de jours après l'épreuve	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Vaccination p19																					
T 426	-	-	-	-	-	.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 427	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrôles																					
Eau physiologique, RCA/FIA																					
T 436	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 425	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 438	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrôles																					
Non-vaccinés																					
T 448	.008	.03	.05	0.1	0.3	0.7	0.8	.16	.14	.09	.008	.004	.004	.008	.008	.008	.008	.008	.008	.008	.008
T 449	.004	.01	.02	.03	0.07	0.5	0.8	0.2	.07	.07	.04	.06	.06	.05	.03	.03	.03	.03	.03	.02	.02

— = Absence de parasites dans 400 champs microscopiques



FIGURE 9A



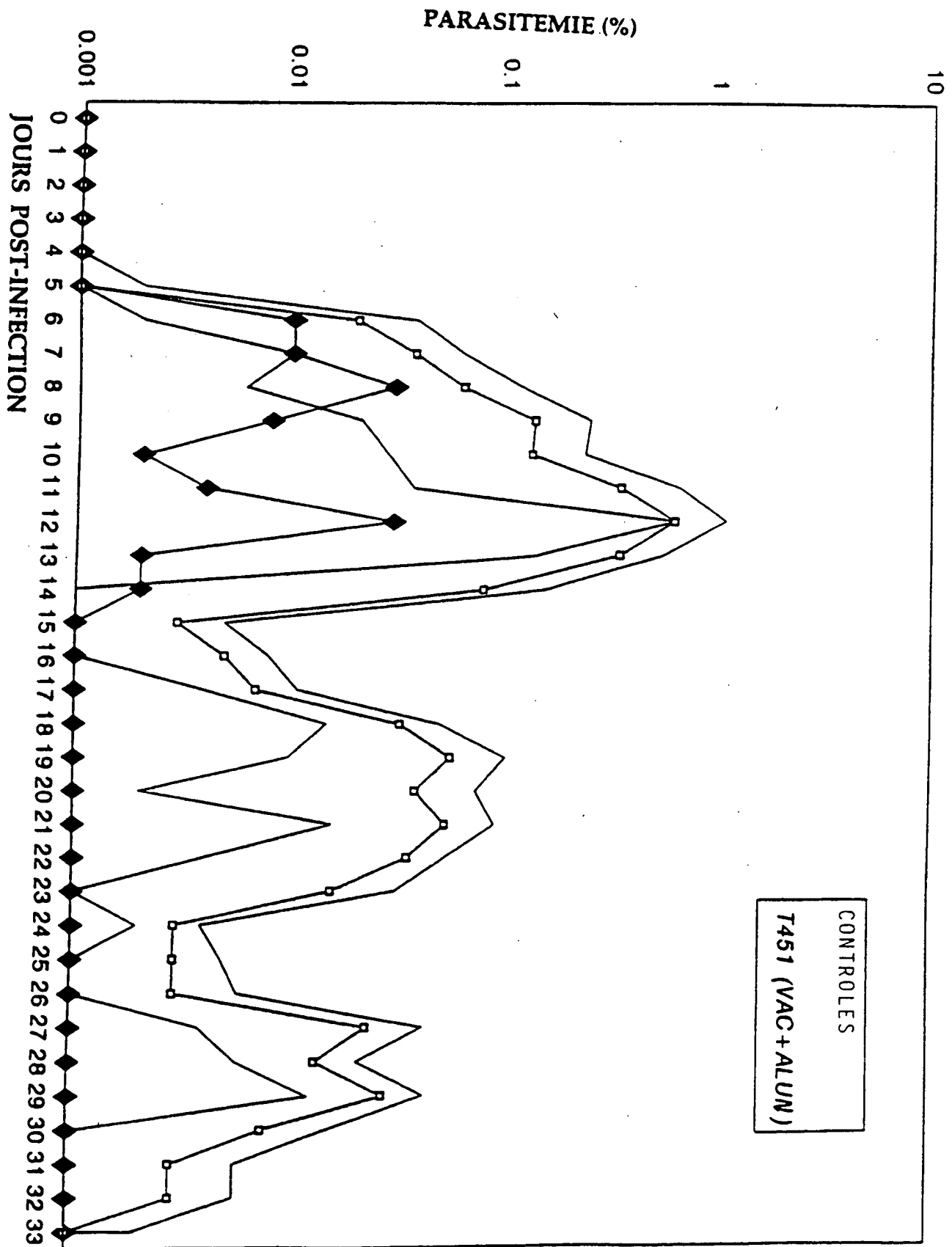
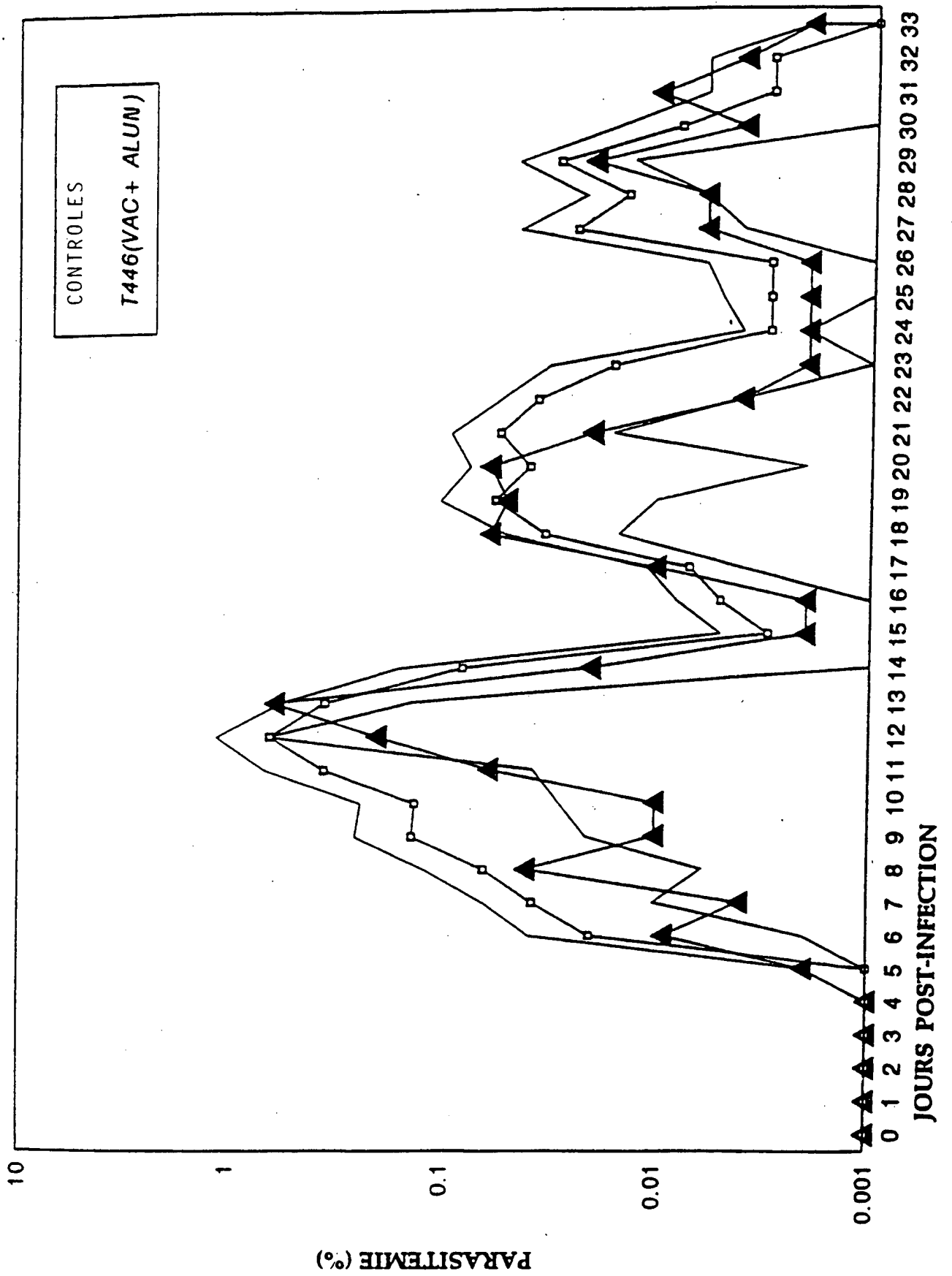
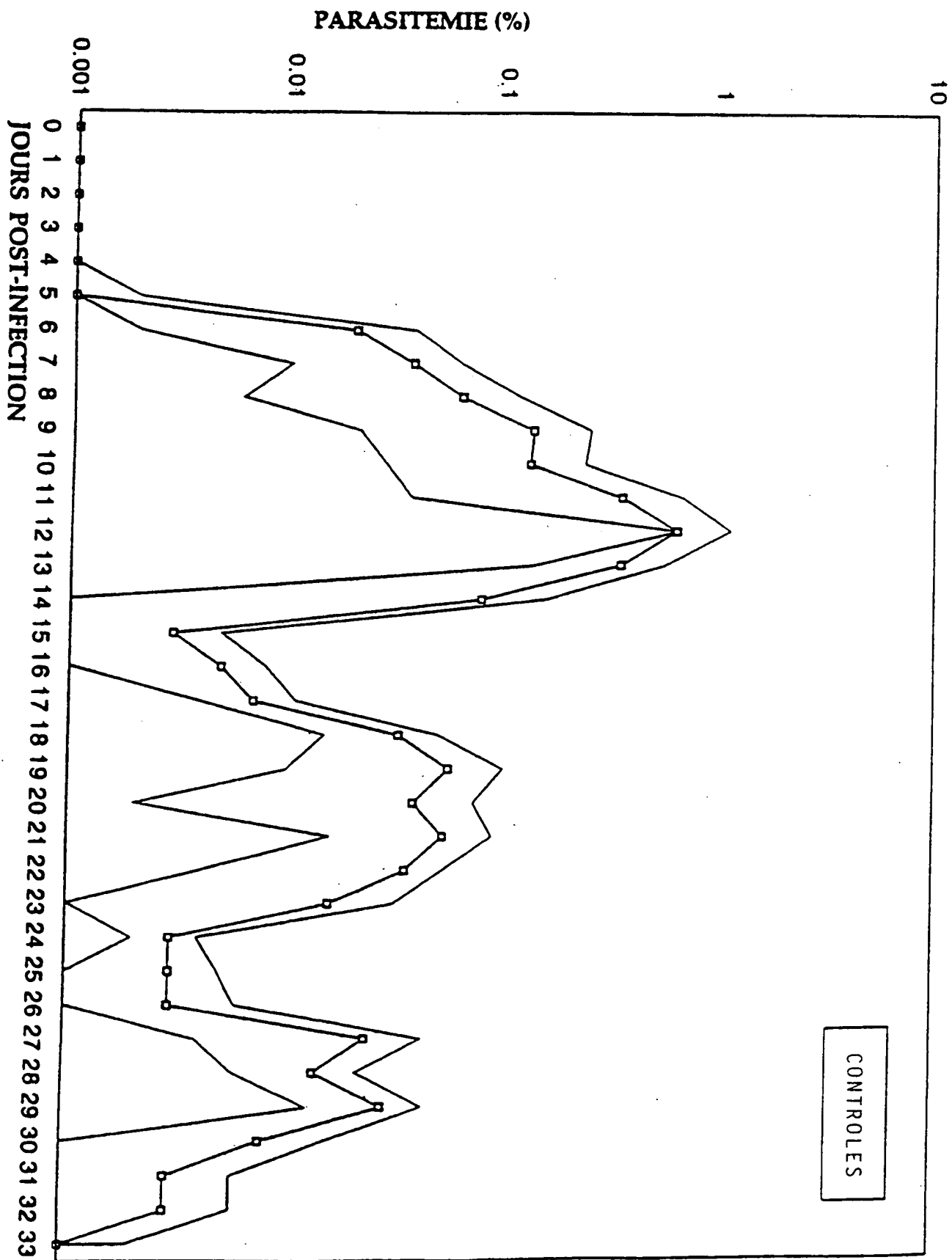


FIGURE 98

FIGURE 9C





Essai de vaccination *P. cynomolgi* / singe toque avec le MSP-1 p19 de *P. cynomolgi* en alun

	Année	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
	Mois	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Jour	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<b>GROUPE 1</b>																				
<b>(19 + ALUN)</b>																				
T 446		0.002	0.009	0.004	0.04	0.01	0.01	0.06	0.2	0.6	0.02	0.002	0.002	0.01						
T 447		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 453		-	0.01	0.01	0.03	0.008	0.002	0.004	0.03	0.002	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GROUPE 2</b>																				
<b>(NS + ALUN)</b>																				
T 450		0.002	0.01	0.05	0.04	0.06	0.04	0.12	0.2	0.12	0.02	0.006	0.01	0.01						
T 454		0.002	0.05	0.06	0.14	0.3	0.14	0.8	1.3	0.63	0.02	0.002	0.002	0.01						
T 455		-	-	-	0.008	0.05	0.008	0.14	0.4	0.3	0.2	0.002	0.002	0.002						

- négatif pour des parasites dans 400 champs microscopiques

Essai de vaccination *P. cynomolgi* / singe toque avec le MSP-1 p19 de *P. cynomolgi* en alun

[illegible]

– négatif pour des parasites dans 400 champs microscopiques

# ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*

MSP-1 p19 VACCINATION AVEC ALUN

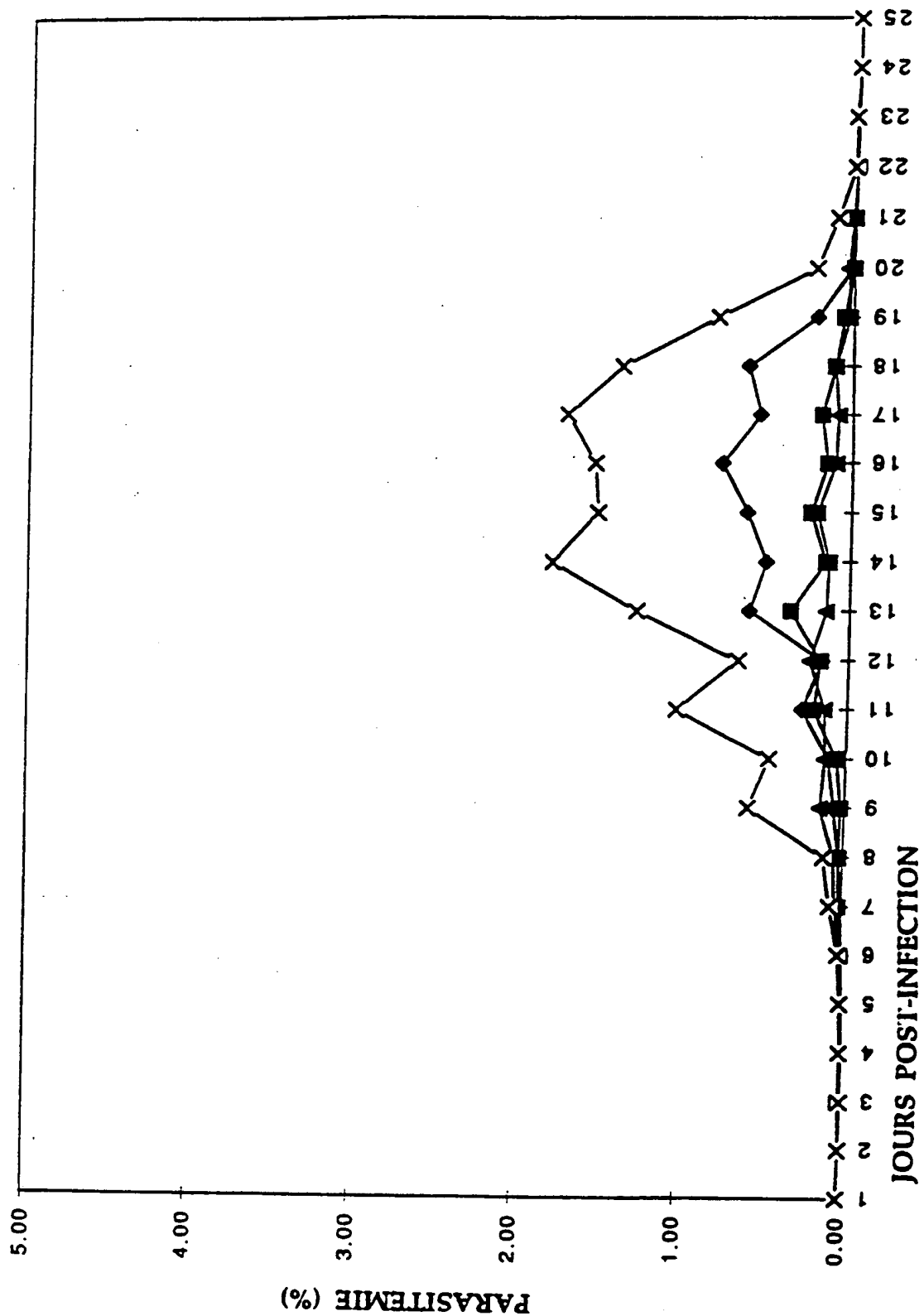


FIGURE 10A

# ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE ÉUCREUIL *SAIMIRI SCIUREUS*

MSP-1 p19 VACCINATION AVEC FREUNDS

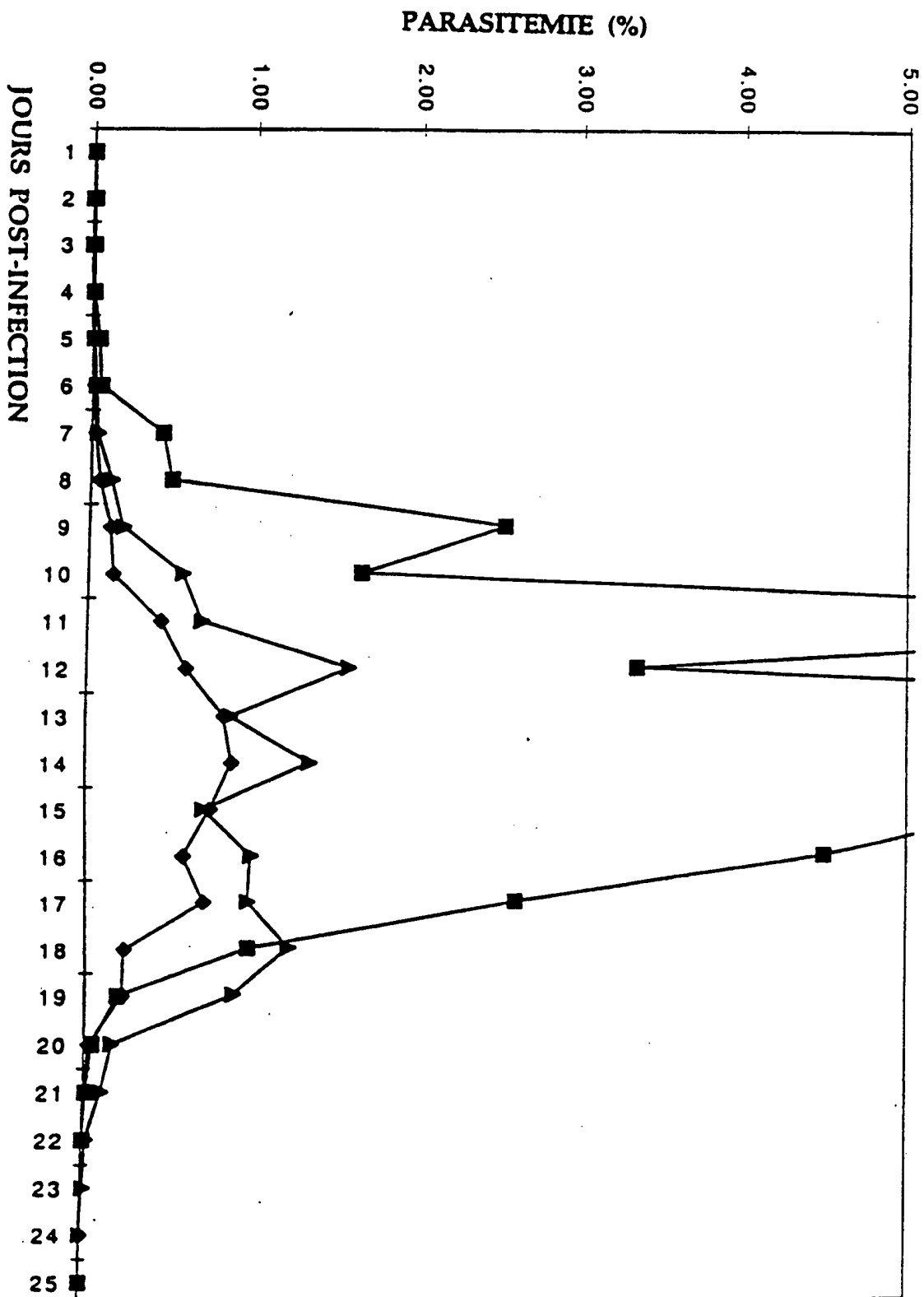


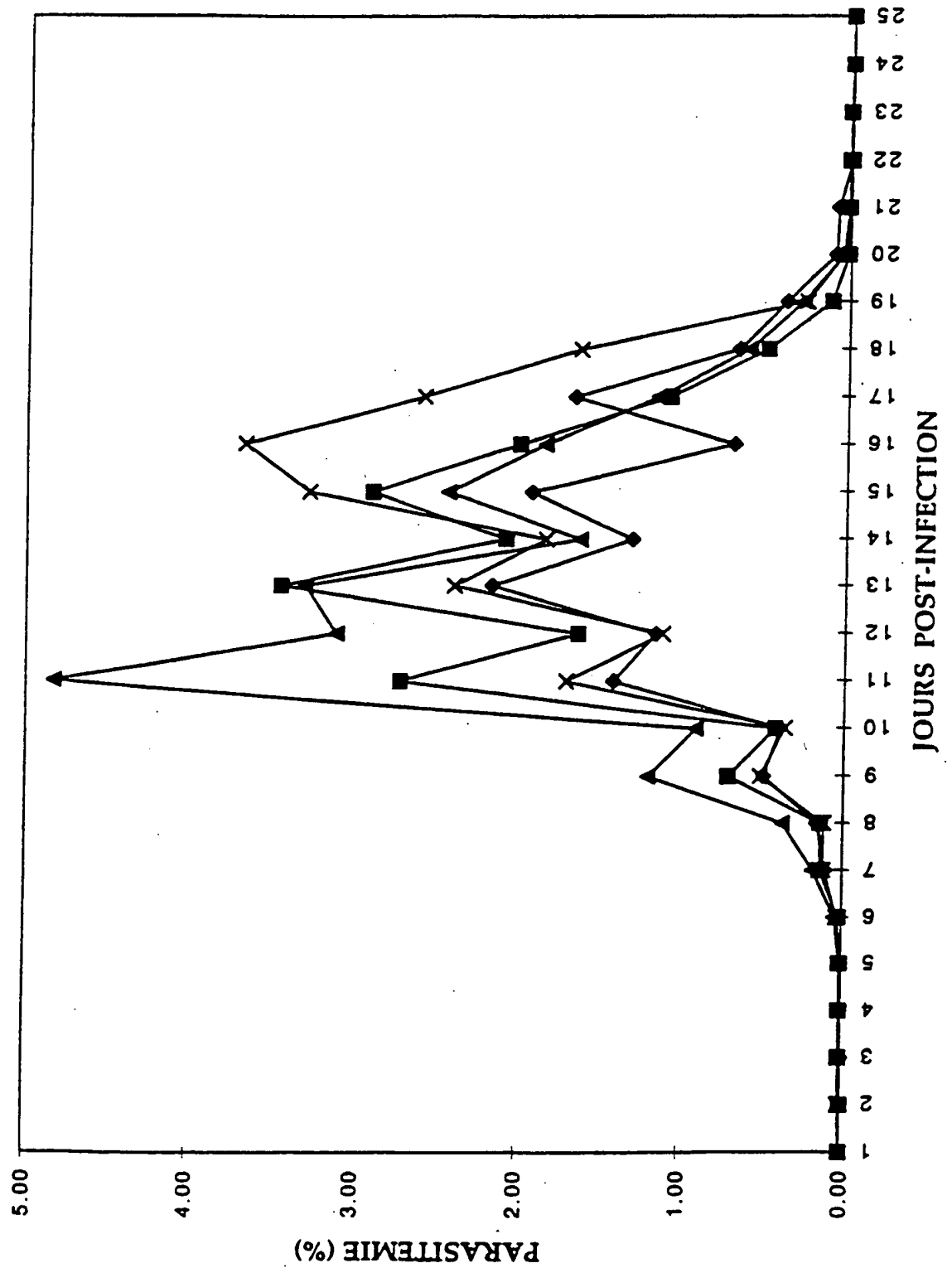
FIGURE 108

—◆— Freund-4  
—■— Freund-6  
—▲— Freund-8



ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS  
MSP-1 p19 VACCINATION AVEC LIPOSOMES

FIGURE 10C



# ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS* CONTROLE ALUN

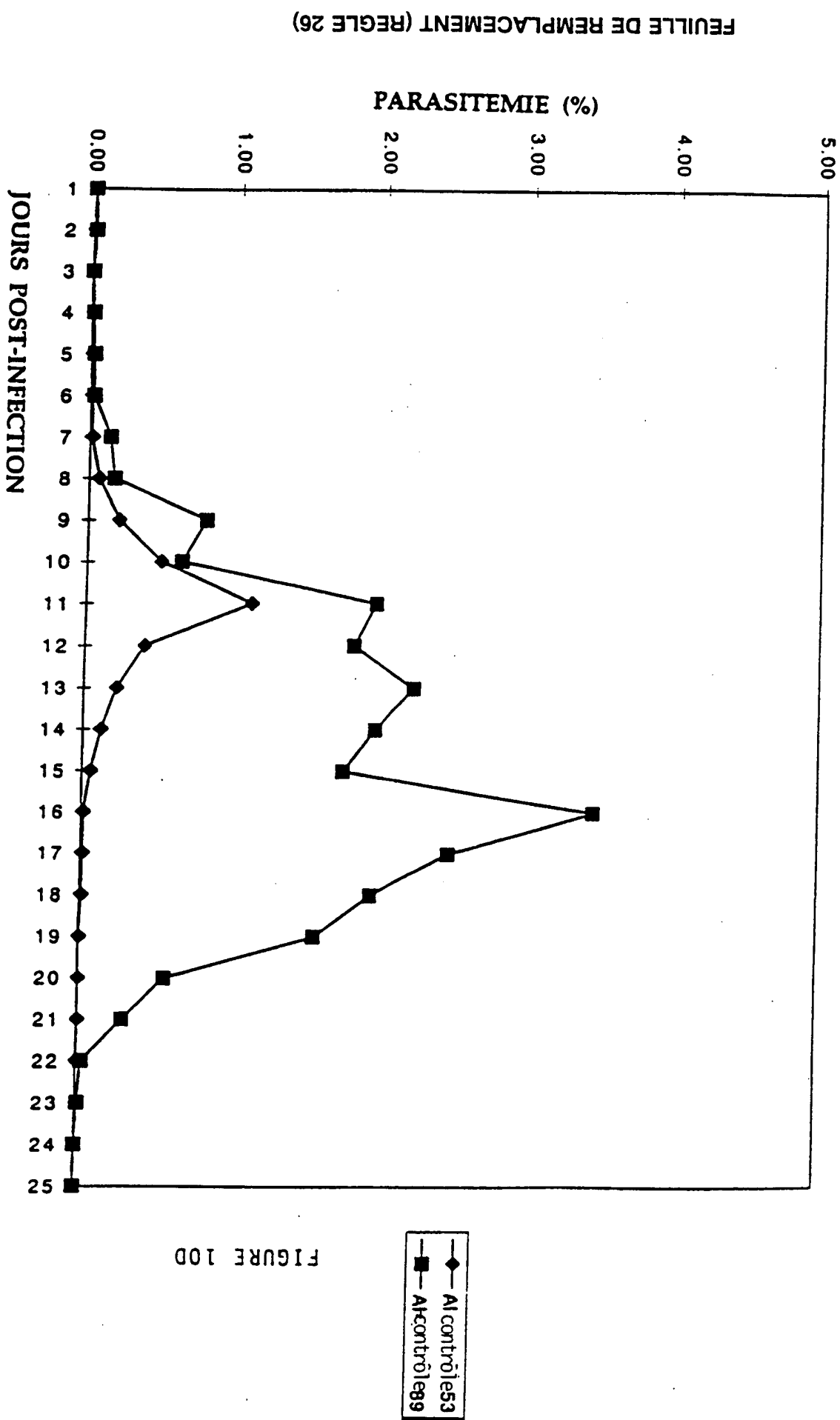
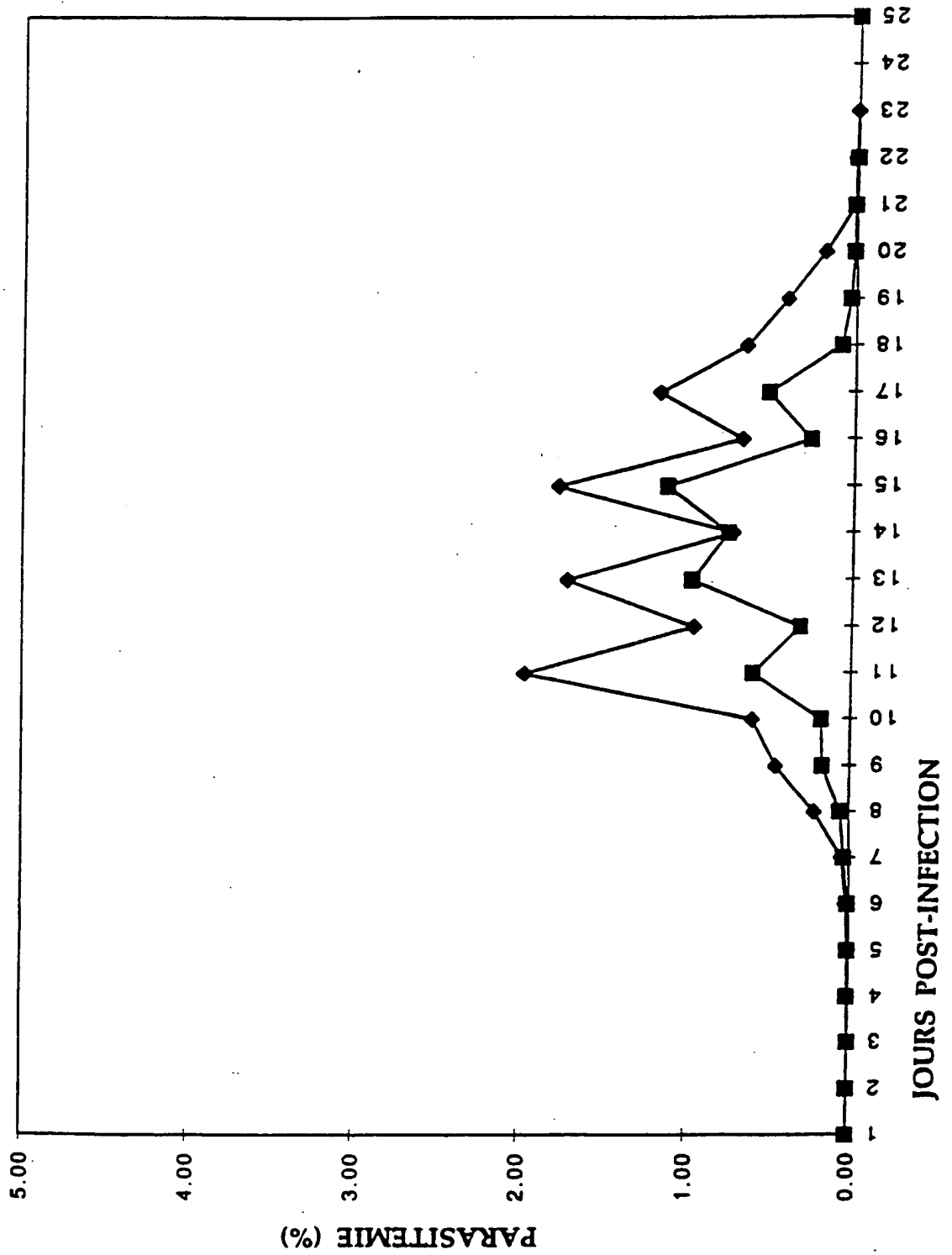


FIGURE 100

ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*  
 CONTROLE FREUNDS



# ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE ÉCREUIL *SAIMIRI SCIUREUS* CONTROLE LIPOSOME

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

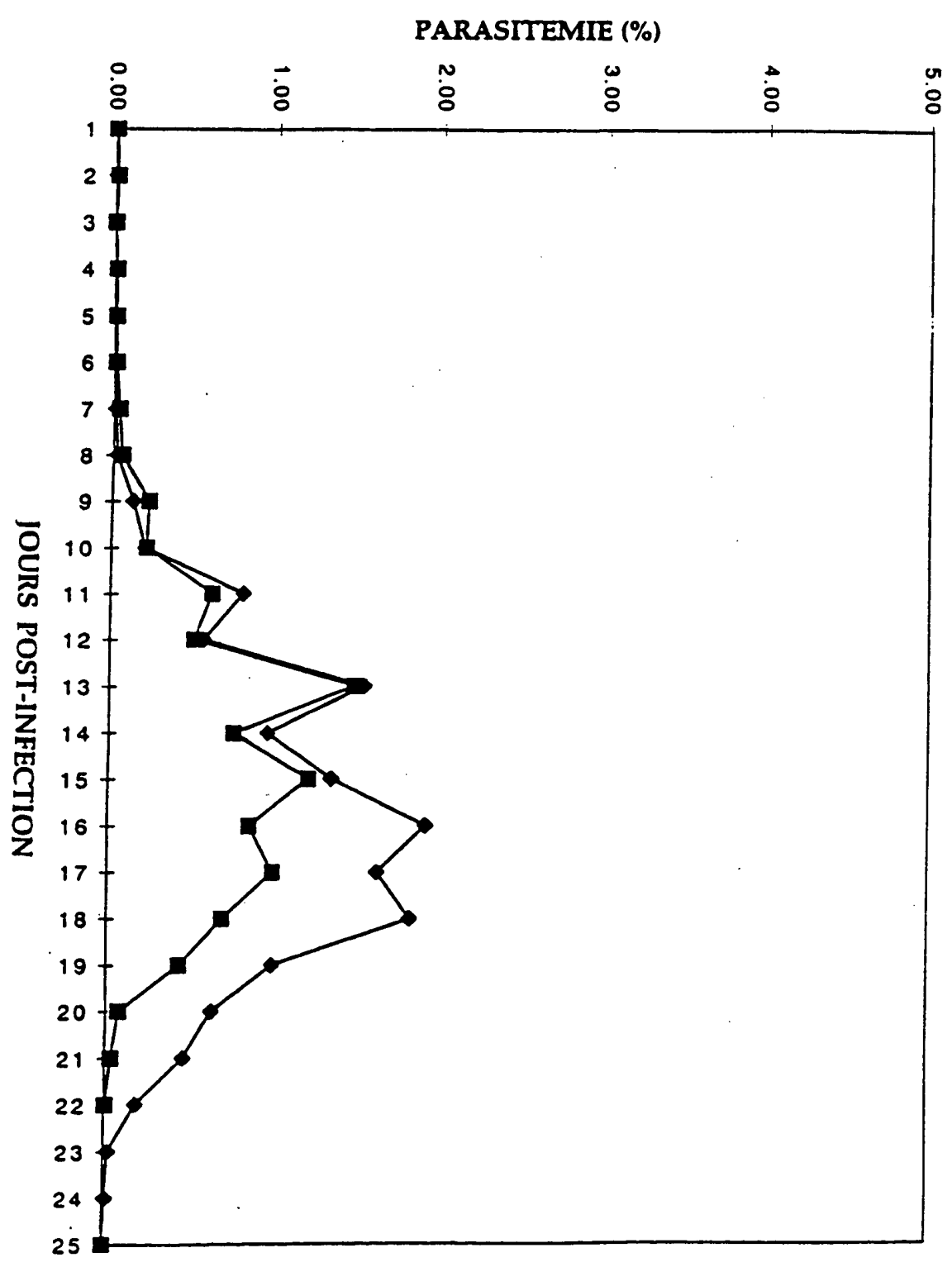
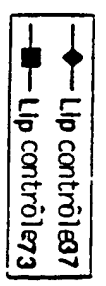


FIGURE 10F



ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *EUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*  
 CONTROLE EAU PHYSIOLOGIQUE

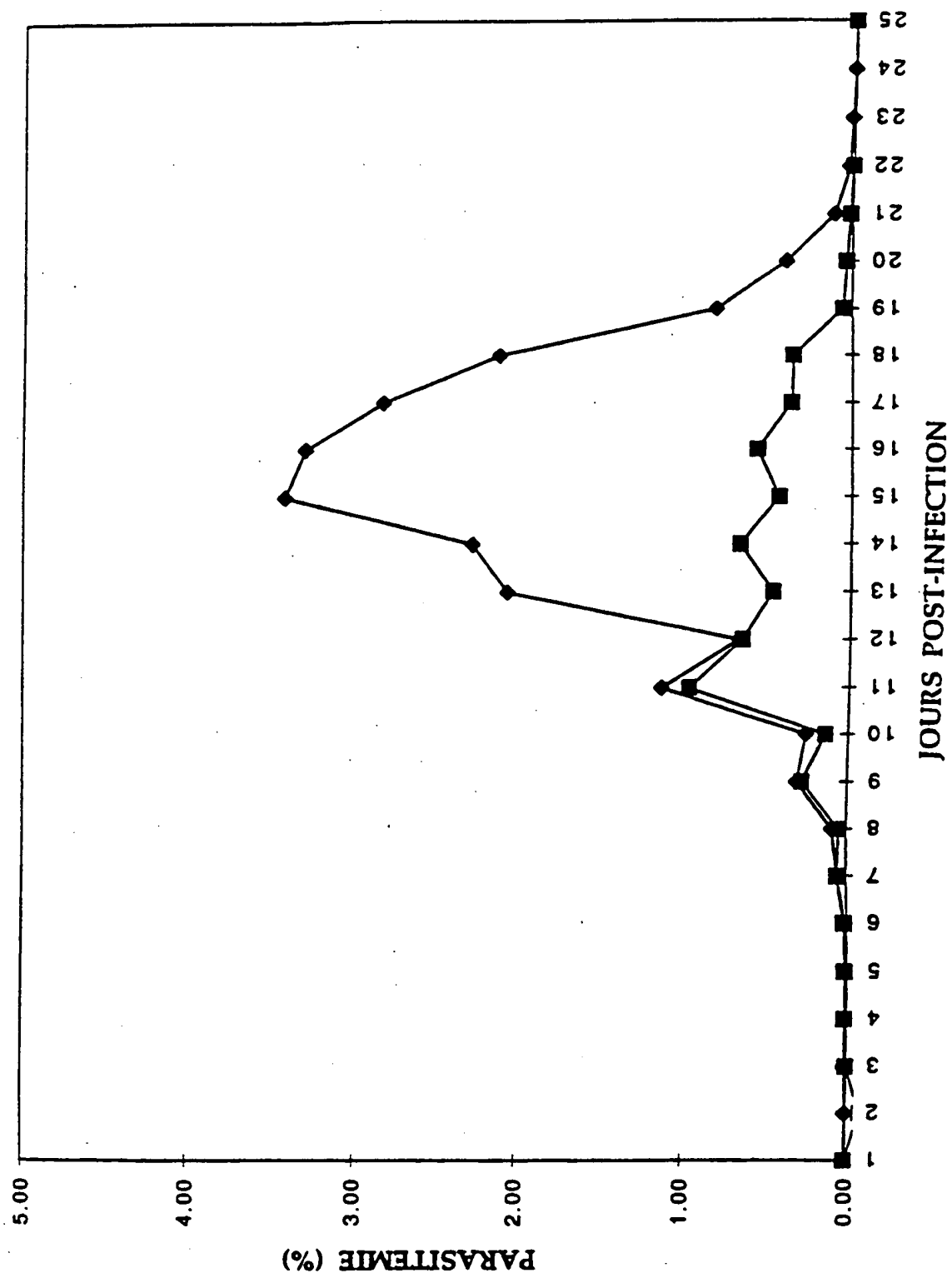


FIGURE 10G

**This Page Blank (uspto)**

---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/00290

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/30 C12N15/86 C07K14/445 C07K16/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 74, no. 1, 20 December 1995, pages 105-111, XP000603955 LONGACRE, S.: "The Plasmodium cynomolgi merozoite surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other Plasmodium species" cited in the application	1,13,25, 30,31,42
Y	see page 107, column 1, line 4 - line 9  see page 109, column 1, line 5 - line 11; figures 1,2  --- -/--	2,4-12, 16, 26-29,42

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 1997

Date of mailing of the international search report

16.09.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/00290

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 January 1994, pages 191-205, XP000603954 LONGACRE, S. ET AL.: "Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus" cited in the application	2,4-12, 1, 26-29,42
X	see the whole document	17,20
X	--- WO 93 17107 A (MEDICAL RES COUNCIL) 2 September 1993	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	see the whole document	1,13, 17-22, 24-42
X	--- MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 60, no. 2, 1 January 1993, pages 303-310, XP000603763 CHAPPEL, J.A. & HOLDER, A.A.: "Monoclonal antibodies that inhibit Plasmodium falciparum invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1"	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	see the whole document	2,4-13, 16,19, 24-45
X	--- JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 2, 15 July 1992, BALTIMORE US, pages 548-555, XP000605417 CHANG, S.P. ET AL.: "A carboxy-terminal fragment of Plasmodium falciparum gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth" see the whole document	1,2,17, 18,42
Y	--- EP 0 154 454 A (WELLCOME FOUND) 11 September 1985  see page 2, paragraph 3 - page 13, paragraph 2; claims; example 7 ---	1,2,5,6, 12, 16-22, 24-38, 40-45
	---	

-/--



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00290

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 2 June 1996, page A1117 XP000604872 ANGOV E ET AL: "CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT PLASMODIUM FALCIPARIUM MSP 1 C-TERMINAL FRAGMENT USING CONFORMATION-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES" see abstract</p> <p>-----</p>	20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/00290

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see annexe
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see annexe

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**1. Claims 1 2 4-16, 18, 26, 42, 43 and partially 17, 19, 25, 27-39:**

Recombinant protein of which the essential constitutive polypeptide sequence is:

- either that of a C-terminal fragment of 19 kilodalton (p19) of the merozoite surface protein 1 (protein MSP-1) of a parasite of the *Plasmodium* type, other than *Plasmodium vivax*, and infectious for mammals, particular humans;
- or of a portion of said fragment since it is also susceptible of inducing an immune response capable of inhibiting a parasitemy *in vivo* due to the corresponding parasite;
- or of a peptide capable of inducing an immunological response of the cellular and/or humoral type equivalent to that which is produced by said fragment p19 or to said fragment portion; baculoviral vector for the expression of this protein, organism transfected by such vector, synthetic DNA containing a sequence coding for said protein and utilization in vaccinating compositions.

**2. Claims 17 and 19, both partially:**

Vaccinating composition against a parasite of the *Plasmodium* type infectious for humans and containing as active principle a recombinant protein of which the essential constitutive polypeptide sequence is:

- either that of a C-terminal fragment of 19 kilodalton (p19) of the merozoite surface protein 1 (protein MSP-1) of a parasite of the *Plasmodium* type, infectious for humans;
  - or of a portion of this fragment since the protein is also susceptible of inducing an immune response capable of inhibiting a parasitemy *in vivo* due to the corresponding parasite;
  - or of a peptide capable of inducing an immunological response of the cellular and/or humoral type equivalent to that produced by the fragment p19 or to said portion of this fragment;
- this recombinant protein further comprising conformational epitopes unstable in a reducing medium; in the case not covered by the subject 1 of a protein unrelated to claims 2 to 13 or 16.

**3. Claims 20-22, 24, 40, 41, 45**

Production of a specific antibody which recognizes selectively the p19 of a protein MSP-1 of the merozoite form of a *Plasmodium* parasite infectious for humans other than *Plasmodium vivax* and which does not recognize *Plasmodium vivax*; utilisation for diagnostic or purification purposes, and hybridome secreting the corresponding monoclonal antibodies.

The complete search report has been established.

**Obscurity:**

In claim 3, the terms "corresponding p42 produced in the same conditions" are vague and leave someone in doubt as to the signification of the technical characteristics to which they refer. Furthermore, the syntax of this claim is equivocal thereby introducing an ambiguity as to the real object of the claim. It would be necessary to reformulate this claim in order to eliminate any uncertainty.

**Incoherences:**

Claim 23 relates to "a monoclonal antibody according to claim 20 characterized in that it recognizes specifically p19 of *P. vivax*." Now then, claim 20 characterizes the antibody concerned by the fact that it "does not recognize *P. vivax*". Consequently, this is consequently incoherent and this claim could not be searched.

Claim 44 relates to "a vaccine composition according to claim 23". Now, claim 23 relates to an antibody. Consequently, the object of the claim is not clearly defined. The search has been carried out while considering that it referred to a vaccine composition according to claim 43.

**Incomplete search:**

Claims for which a complete search has been made:  
Claims for which a complete search has not been made:

1, 2, 4-22, 24-45  
3, 23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00290

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9317107 A	02-09-93	AU 3570493 A	13-09-93
		CA 2128109 A	02-09-93
		EP 0627004 A	07-12-94
		JP 7504321 T	18-05-95
		NZ 249208 A	26-03-96
-----			
EP 0154454 A	11-09-85	AU 592749 B	25-01-90
		AU 3904685 A	05-09-85
		GB 2154592 A	11-09-85
		IL 74409 A	26-08-94
		JP 2584733 B	26-02-97
		JP 61019490 A	28-01-86
		JP 6189772 A	12-07-94
		US 5597708 A	28-01-97
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No  
PCT/FR 97/00290

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/30 C12N15/86 C07K14/445 C07K16/20		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 74, no. 1, 20 Décembre 1995, pages 105-111, XP000603955 LONGACRE, S.: "The Plasmodium cynomolgi merozoite surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other Plasmodium species" cité dans la demande	1,13,25, 30,31,42
Y	voir page 107, colonne 1, ligne 4 - ligne 9  voir page 109, colonne 1, ligne 5 - ligne 11; figures 1,2  ---  -/--	2,4-12, 16, 26-29,42
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  25 Août 1997		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  16.09.97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Chambonnet, F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No  
PCT/FR 97/00290

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 Janvier 1994, pages 191-205, XP000603954 LONGACRE, S. ET AL.: "Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus" cité dans la demande	2,4-12, 16, 26-29,42
X	voir le document en entier ---	17,20
X	WO 93 17107 A (MEDICAL RES COUNCIL) 2 Septembre 1993	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	voir le document en entier	1,13, 17-22, 24-42
X	---	
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 60, no. 2, 1 Janvier 1993, pages 303-310, XP000603763 CHAPPEL, J.A. & HOLDER, A.A.: "Monoclonal antibodies that inhibit Plasmodium falciparum invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1"	1,2,4-7, 10-12, 16-18,42
Y	voir le document en entier	2,4-13, 16,19, 24-45
X	---	
X	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 2, 15 Juillet 1992, BALTIMORE US, pages 548-555, XP000605417 CHANG, S.P. ET AL.: "A carboxy-terminal fragment of Plasmodium falciparum gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth" voir le document en entier	1,2,17, 18,42
Y	---	
Y	EP 0 154 454 A (WELLCOME FOUND) 11 Septembre 1985  voir page 2, alinéa 3 - page 13, alinéa 2; revendications; exemple 7 ---	1,2,5,6, 12, 16-22, 24-38, 40-45
	---	
	-/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No  
PCT/FR 97/00290

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	<p>FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 2 Juin 1996, page A1117 XP000604872 ANGOV E ET AL: "CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT PLASMODIUM FALCIPARIUM MSP 1 C-TERMINAL FRAGMENT USING CONFORMATION-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES" voir abrégé</p> <p>-----</p>	20

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°

PCT/FR 97/00290

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2. ☒ Les revendications n°  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir annexe
  
3. ☐ Les revendications n°  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir annexe

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
  
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
  
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.



## SUIITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

## 1. Revendications 1 2 4-16, 18, 26, 42, 43 et partiellement 17, 19, 25, 27-39 :

Protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

.soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, autre que *Plasmodium vivax*, et infectieux pour des Mammifères, notamment pour l'Homme;

. soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie *in vivo* due au parasite correspondant;

. soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment; vecteur baculoviral pour l'expression de cette protéine, organisme transfecté par un tel vecteur, ADN synthétique contenant une séquence codant pour cette protéine et utilisation dans des compositions vaccinales.

## 2. Revendications 17 et 19, toutes deux partiellement:

Composition vaccinale contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'Homme contenant à titre de principe actif une protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

.soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme;

. soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie *in vivo* due au parasite correspondant;

. soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment; cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur; dans le cas non couvert par le sujet 1 d'une protéine ne relevant pas des revendications 2 à 13 ou 16.

## 3. Revendications 20-22, 24, 40, 41, 45

Production d'un anticorps spécifique reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaissant pas *Plasmodium vivax*; utilisation à des fins diagnostiques ou de purification, et hybridome sécrétant d'anticorps monoclonaux correspondants.

Le rapport de recherche complète a été établi.

## Obscurité :

Dans la revendication 3, les termes "p42 correspondante produite dans les mêmes conditions" sont vagues et laissent un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles ils se réfèrent. De plus la syntaxe de cette revendication est équivoque ce qui introduit une ambiguïté quant à l'objet réel de la revendication. Il serait nécessaire de reformuler cette revendication pour éliminer toute incertitude.

## Incohérences:

La revendication 23 concerne un "anticorps monoclonal selon la revendication 20 caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. vivax*". Or la revendication 20 caractérise l'anticorps concerné par le fait qu'il "ne reconnaît pas *P. vivax*". Il y a par conséquent incohérence et cette revendication n'a pu être recherchée.

La revendication 44 concerne une "composition de vaccin selon la revendication 23". Or la revendication 23 se rapporte à un anticorps. Par conséquent l'objet de la revendication n'est pas clairement défini. La recherche a été effectuée en considérant qu'il s'agissait d'une composition de vaccin selon la revendication 43.

## Recherche incomplète :

Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes :

1, 2, 4-22, 24-45

Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches complètes :

3, 23

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No  
PCT/FR 97/00290

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9317107 A	02-09-93	AU 3570493 A	13-09-93
		CA 2128109 A	02-09-93
		EP 0627004 A	07-12-94
		JP 7504321 T	18-05-95
		NZ 249208 A	26-03-96
-----			
EP 0154454 A	11-09-85	AU 592749 B	25-01-90
		AU 3904685 A	05-09-85
		GB 2154592 A	11-09-85
		IL 74409 A	26-08-94
		JP 2584733 B	26-02-97
		JP 61019490 A	28-01-86
		JP 6189772 A	12-07-94
US 5597708 A	28-01-97		
-----			